GE Healthcare
Life Sciences

Biacore

Biacore T100

Ver. 2

Instrument Handbook

日本語取扱説明書

取扱店

GE imagination at work

目　次

1. セットアップ 1

1-1. 電源およびソフトウェアの起動 1

1-1-1. 電源の立ち上げ 1

1-1-2. ランニング緩衝液、超純水のセット 2

1-1-3. コントロールソフトウェアの起動 4

1-2. システムの初期化 5

1-2-1. センサーチップの挿入 5

1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化 9

1-2-3. 温度設定 10

1-2-4. 試料のセットと取り出し 11

2. 基本操作 14

2-1. マニュアル測定の実行方法 15

2-1-1. 試料の添加 18

2-1-2. レポートポイントの追加 20

2-1-3. 測定の終了 22

2-2. ファイルの保存 22

2-3. データの印刷 22

3. 固定化 23

3-1. アミンカップリング法 25

3-1-1. リガンド希釈液の pH 選択 27

3-1-2. 基本プロトコールでの固定化 34

3-1-3. 固定化量を調節して固定化 41

4. マニュアル測定による相互作用の条件検討 45

5. 相互作用測定 53

5-1. 反応速度定数・解離定数の算出　マルチサイクル法 54
5-1-1. プログラムの実行 57
5-1-2. カーブフィッティングによる解析 66
5-1-3. 平衡値解析 87

5-2. 反応速度定数・解離定数の算出　シングルサイクル法 93
5-2-1. プログラムの実行 94
5-2-2. カーブフィッティングによる解析 109

5-3. 濃度測定 123
5-3-1. プログラムの実行 124
5-3-2. データ解析 134

5-4. 検量線不要の濃度測定 143
5-4-1. プログラムの実行 148
5-4-2. データ解析 165

5-5. 結合の有無の確認、スクリーニング 174
5-5-1. プログラムの実行 174
5-5-2. データ解析 183

5-6. 熱力学的パラメータの算出 193
5-6-1. プログラムの実行 195
5-6-2. データ解析 203

5-7. 低分子化合物アナライトの相互作用測定 211
5-7-1. プログラムの実行 214
5-7-2. データ解析 224

5-8. 結合アナライトの回収 233
5-8-1. プログラムの実行 234

6. メソッドによるプログラムの作成 247

6-1. ウィザードで作成保存したプログラムの呼び出し 248

6-2. メソッドの編集 249

6-3. メソッドの実行 270

7. メンテナンス 274

7-1. システムの洗浄 277
7-1-1. Desorb 277
7-1-2. Desorb and Sanitize 278
7-1-3. Empty Buffer Tubing 281
7-1-4. Wash Buffer Tubing 283

7-2. シグナルの校正 285
7-2-1. Normalize 285

7-3. システムチェック 286

8. 実験の終了 289

8-1. スタンバイ状態での放置 289

8-2. 電源の落とし方 289

8-3. センサーチップの保存 290

9. センサーグラムの編集 292

9-1. ソフトウェアの起動 292

9-2. ファイルの呼び出し 293

9-3. センサーグラムの編集 295
9-3-1. センサーグラムの選択 295
9-3-2. センサーグラムの表示の変更 297
9-3-3. センサーグラムの添加開始時間、ベースラインあわせ 298
9-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除 299
9-3-5. センサーグラムの差し引き 300
9-3-6. センサーグラムのノーマライズ 301

9-4. グラフの編集 303

9-5. データの移管 305

9-6. データの保存 307

1. セットアップ

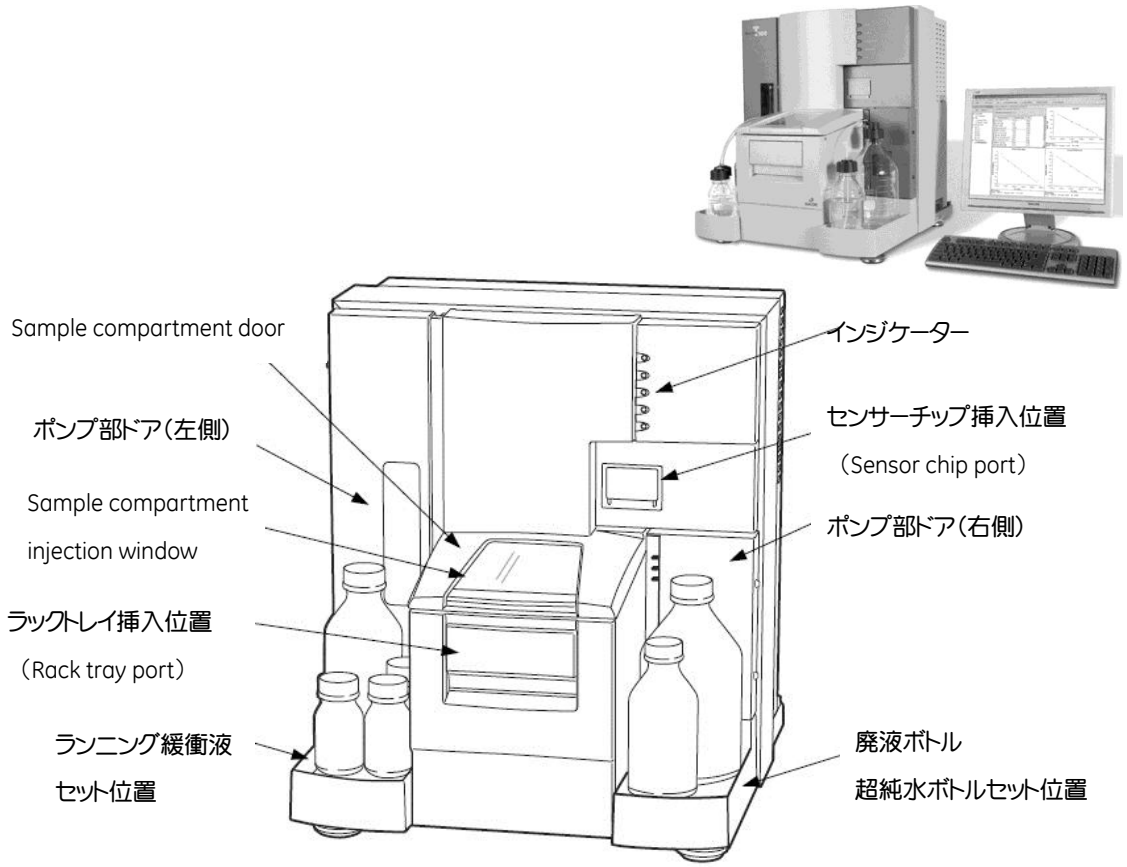
1-1. 電源およびソフトウェアの起動

1-1-1. 電源の立ち上げ

テーブルタップの電源 → プリンター → モニター画面 → システム本体 → コンピューター の順番に電源を入れる。Windows のバージョンにより、パスワード（biacore）の入力が必要な場合がある。

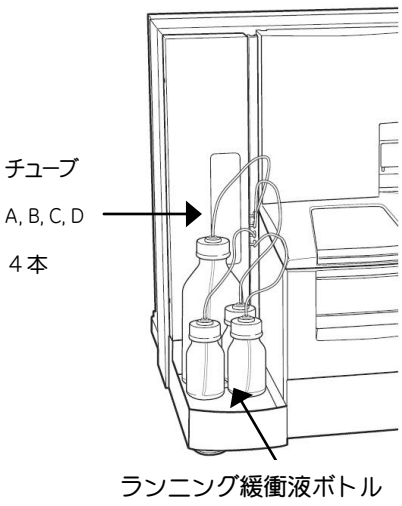
注）装置本体の電源を入れると、本体のフロント右上にあるすべてのインジケーター（LED ランプ）が数秒間点灯し、リセットされて消える。その後 **ready** のインジケーターが点灯し、**temperature** のインジケーターは点滅する。

補足 1-1. 装置の配置

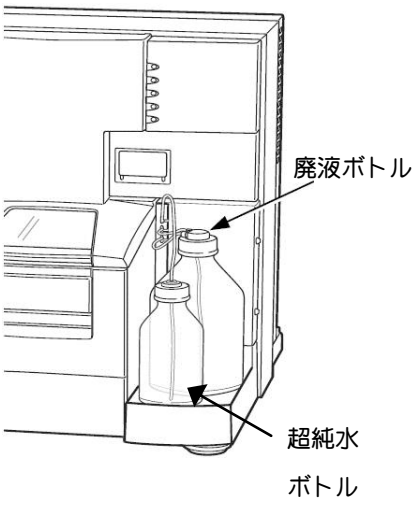


1-1-2. ランニング緩衝液、超純水のセット

本体に向かって、左側トレイにランニング緩衝液ボトルをセットし、チューブ A を挿入する。また、右側トレイには、超純水ボトルおよび廃液ボトルをセットして、対応するチューブを挿入する。



左側；ランニング緩衝液ボトルセット



右側；廃液ボトル・超純水ボトルセット

補足 1-2. チューブの配置

本体左側

チューブ A,B,C,D には、タグがついているので確認する。

チューブ A	ランニング緩衝液ボトルに入れる。
チューブ B,C,D	必要に応じて複数のランニング緩衝液をセットできる。

本体右側

超純水チューブ	超純水を入れた 500 ml ボトルに入れる。
廃液チューブ（2 本）	廃液ボトルキャップに接続する。

補足 1-3. ランニング緩衝液の種類

ランニング緩衝液として、弊社から HBS 緩衝液および PBS 緩衝液を販売している。

HBS-EP+ 10X　（1000 ml, BR-1006-69）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 30 mM EDTA, 0.5 % v/v Surfactant P 20

⇒超純水で 10 倍希釈

0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-P+ 10X　（1000 ml, BR-1006-71）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.5 % v/v Surfactant P 20

⇒超純水で 10 倍希釈

0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.05 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-N 10X　（1000 ml, BR-1006-70）

0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl

⇒超純水で 10 倍希釈

0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH7.4

PBS 10X　（1000 ml, BR-1006-72）

0.1 M phosphate Buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl

⇒超純水で 10 倍希釈後、5%（v/v） DMSO を混合

0.01 M phosphate Buffer, 2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl, 5% DMSO, pH7.4

HBS-EP　（200 ml, BR-1001-88）

0.01M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % v/v Surfactant P 20, pH7.4

HBS-P　（200 ml, BR-1003-68）

0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005 % Surfactant P 20, pH7.4

HBS-N　（200 ml, BR-1003-69）

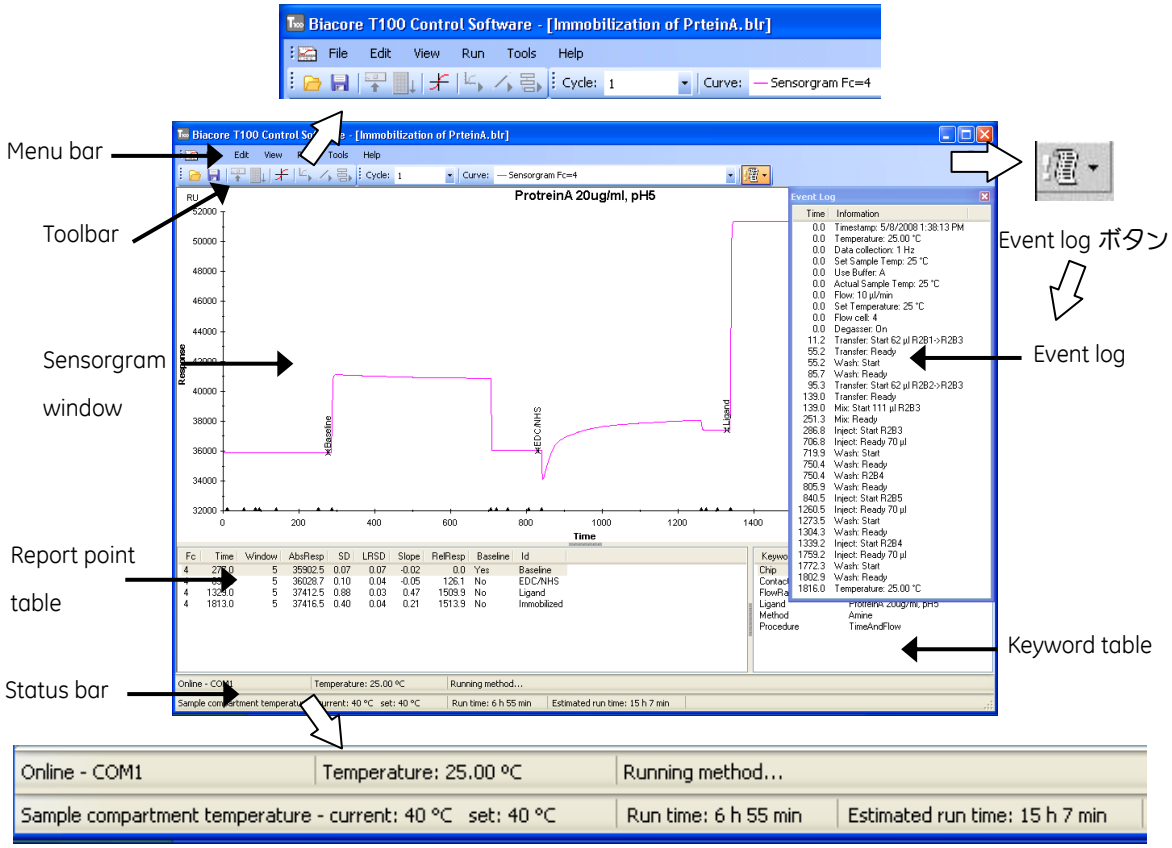
0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH7.4

実験目的にあわせ、緩衝液の変更は可能であるが、各自で調製する場合には、0.22 µm フィルターでろ過をおこなう。

1-1-3. コントロールソフトウェアの起動

初期画面中の左下の **Start** から、**All programs** → **Biacore** → **Biacore T100 Control Software** のアイコンをクリックする。

補足 1-4. 画面の説明

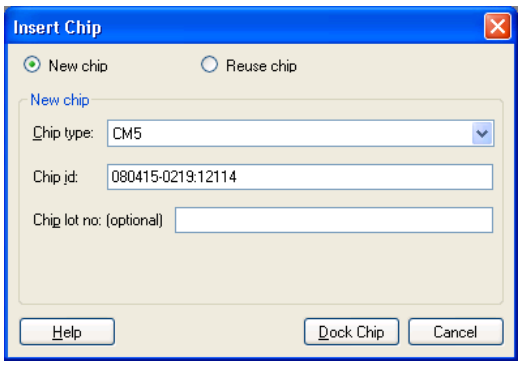


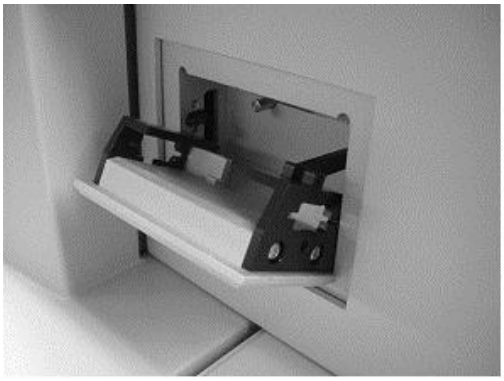
Menu bar	Biacore T100 で実行可能なほとんどの操作コマンドが含まれる。
Toolbar	使用頻度の高いコマンドをアイコン化。簡便にコマンド操作を選択できる。その時点で実行可能なコマンドのみ選択可能。
Sensorgram window	センサーグラムをリアルタイムに表示。
Report point table	任意時間のレスポンスを数値で表示。結合量の算出等に使用。
Event log	測定中の操作内容を表示。
Status bar	現在のシステムの状態を表示。 オンライン状況、システム温度（Temperature）、センサーチップのタイプ、サンプル温度（Sample compartment　temperature）、Run 実行状態　など。

1-2. システムの初期化

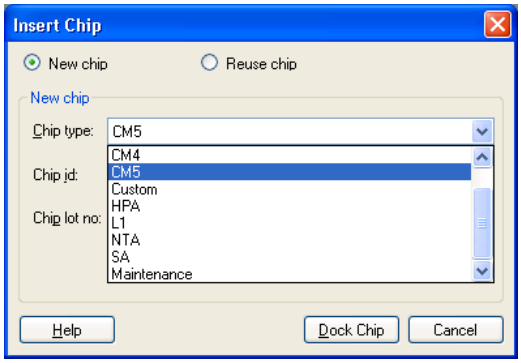
1-2-1. センサーチップの挿入

コントロールソフトウェアを起動すると Insert Chip ダイアログが表示され、同時に T100 本体右側のセンサーチップポートが自動的に開く。





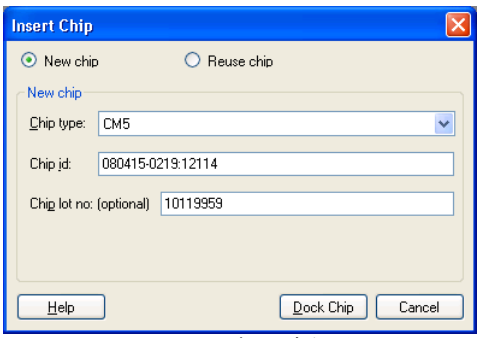
↓



Series S センサーチップ CM5

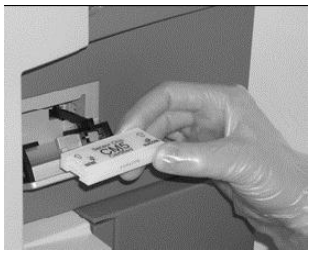
新品のセンサーチップを使用する際は、〇**New Chip** に、再利用のセンサーチップの場合は、〇**Reuse Chip** にチェックを入れ、使用する **Chip type** を選択する。（再利用のセンサーチップを使用する場合は、7 ページを参照。）

↓



Chip id は、日付-時間:システムシリアルナンバーが自動入力される。必要に応じて変更可能。**Chip lot no （optional）** を入力する。

↓



センサーチップを印字面の両側の矢印の方向でセンサーチップポートに挿入する。センサーチップポートを手で押して閉める。

Insert Chip ダイアログの **Dock Chip** をクリックする。

↓

Dock が完了して自動的に **Standby flow** 状態になる。

Standby flow とは、セットしたランニング緩衝液（チューブ A）を低流速で流し続けるモードである。最長 4 日間継続する。（バッファー必要量；65 ml/ 24 時間）

補足 1-5. センサーチップ挿入時の注意事項

センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まっていることを確認してから挿入する。

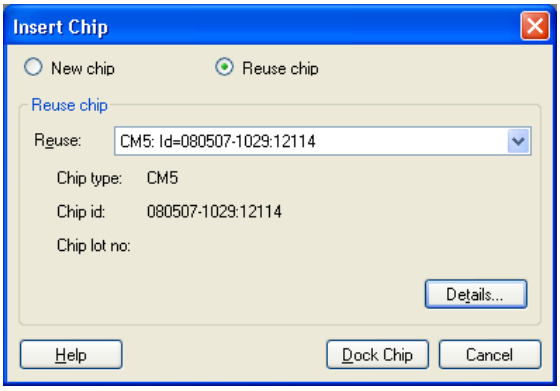
冷蔵庫に保存しているセンサーチップは、室温に戻した後に Dock する。

センサーチップポートを閉じてしまった後、センサーチップを取り出す必要がある場合は、一旦 Insert Chip のダイアログを Cancel する。Toolbar の **Eject** アイコン（ ）を選択して、**Eject Chip** をクリックする。

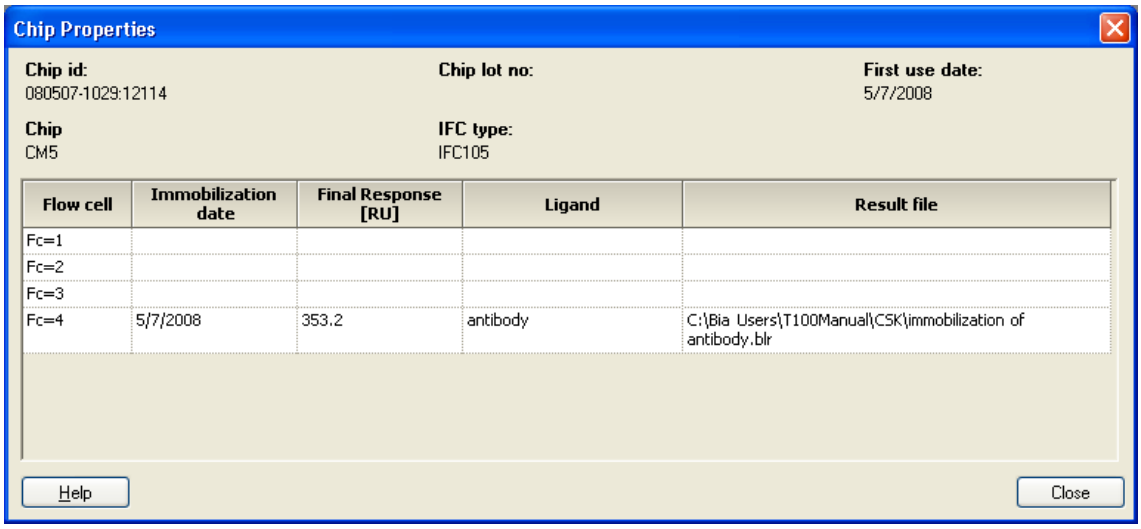
Insert Chip ダイアログを閉じてしまった場合、Toolbar の **Insert** アイコン（ ）を選択すれば、再度ダイアログが表示される。

補足 1-6. センサーチップの固定化履歴

再利用のセンサーチップを使用する場合は、挿入時、〇**Reuse Chip** にチェックを入れると下記のダイアログが表示される。



Reuse:で、そのセンサーチップに対応した id 番号を選択し、**Details...**をクリックすると、固定化履歴が表示される。



確認後、**Close** をクリックする。

センサーチップを取り出して保存する場合は、センサーチップカバーに id を書き込むと、次回使用する際に id を選択しやすい。

補足 1-7. センサーチップの種類

各センサーチップの詳細は弊社総合カタログ等を参照する。

カルボキシル基タイプ（タンパク質、ペプチド、化合物などの固定化）

Series S Sensor Chip CM5	3 枚	BR-1006-68
Series S Sensor Chip CM5 Certified	3 枚	BR-1005-30
Series S Sensor Chip CM4 Certified	3 枚	BR-1005-34
Series S Sensor Chip CM3 Certified	3 枚	BR-1005-36
Series S Sensor Chip C1 Certified	3 枚	BR-1005-35

ストレプトアビジンタイプ（ビオチン標識の DNA やペプチドなどの固定化）

Series S Sensor Chip SA Certified	3 枚	BR-1005-31

疎水基タイプ（リン脂質、糖脂質、膜タンパク質などの固定化）

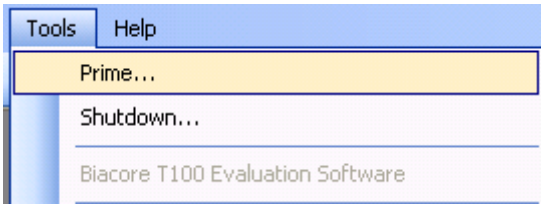
Series S Sensor Chip HPA	3 枚	BR-1005-33
Series S Sensor Chip L1 Certified	3 枚	BR-1005-38

金属キレートタイプ（His-tag タンパク質の固定化）

Series S Sensor Chip NTA	3 枚	BR-1005-32

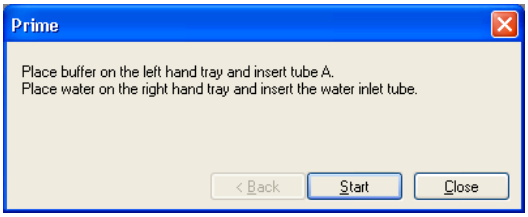
1-2-2. ランニング緩衝液による平衡化

Menu bar の **Tools** → **Prime** を選択する。



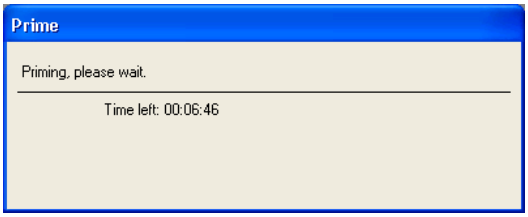
↓

ランニング緩衝液および廃液入れを確認後、**Start** をクリックする。

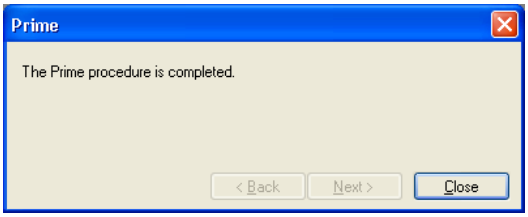


↓

Prime がスタートする。



↓



終了後、**Close** をクリックする。

自動的に **Standby flow** 状態になる。

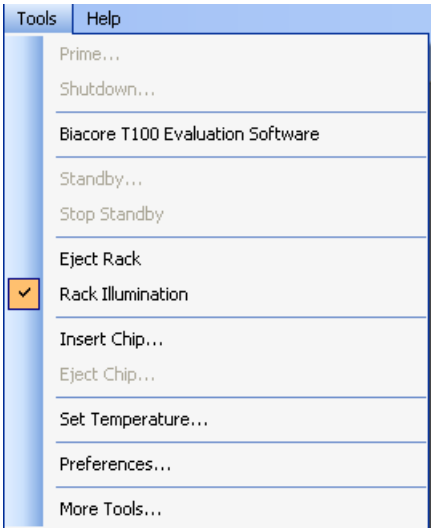
補足 1-8. 実験途中でのランニング緩衝液の交換

Prime は、ポンプやマイクロ流路系、オートサンプラー等をランニング緩衝液で洗浄、置換する操作である。実験の途中でランニング緩衝液を変更する場合にも必ず実行する。

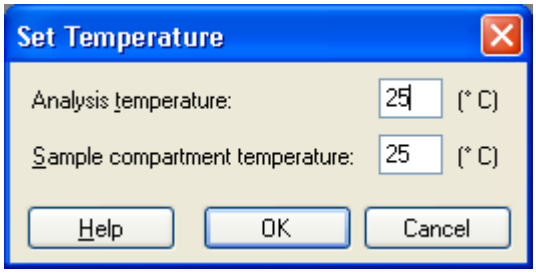
1-2-3. 温度設定

測定温度（Analysis temperature）およびサンプルコンパートメントの温度をそれぞれ設定する。

Menu bar の **Tools** → **Set Temperature...**を選択する。



↓



4～45℃の範囲で設定して、**OK** をクリックする。

（サンプルコンパートメントの温度は室温±15℃以内）

補足 1-9. 設定温度と実際の温度

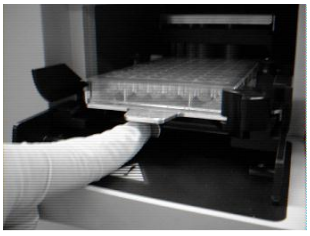
測定は設定温度で安定した後に実施する。

設定温度に達していない場合は画面上の Status bar 中の温度表示が赤の点滅、本体インジケーターの temperature ランプが橙色に点滅する。設定温度で安定した場合には、画面上の温度の表示が黒、インジケーターの temperature ランプは点灯に変わる。

温度が完全に安定するには、ある程度時間を要する。測定温度が室温（25℃）と大きく異なる場合は、あらかじめ設定しておく。

1-2-4. 試料のセットと取り出し

すべての試料はラックトレイにセットし、システム内に挿入する。サンプルコンパートメント内に入っているラックトレイを取り出すには、Toolbar の **Eject Rack** アイコン（ ）をクリックする。速やかにシステム本体前面のラックトレイポートが開きラックトレイが出てくる。

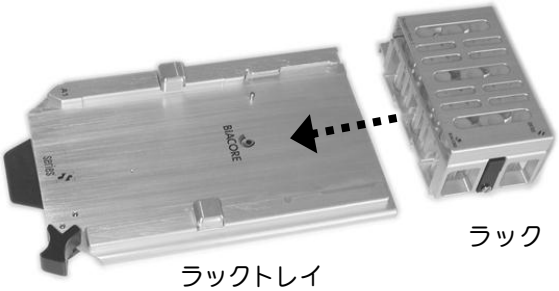


ラックトレイの下に配置した円形のボタンを押すとロックが外れ、ラックトレイを引き出すことが出来る。

同時に画面上に **Eject Rack Tray** ダイアログが表示される。
ラックトレイポートは **60 秒**で自動的に閉まる。
すぐに閉めたい場合は **OK** をクリックする。

補足 1-10. ラックトレイとラックとバイアルの組み合わせ

バイアルをセットするフォルダをラック、ラックをセットするトレイをラックトレイという。



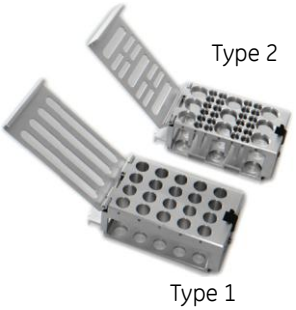
ラック

ラックトレイ

各ラックは次のバイアルがセットできる。バイアルをセットする際は、必ず専用のラバーキャップを使用する。パラフィルムなどニードルの穴を塞ぐ可能性のあるシールは使用しない。

Reagent rack, Type 1

1.5 ml プラスチックバイアル（φ11 mm）x 20 本



Reagent rack, Type 2

16 mm ガラスバイアル（4 ml）x 9 本　または、
15 mm プラスチックバイアル（4 ml）x 9 本
7 mm プラスチックバイアル（0.8 ml）x 24 本

Sample and reagent rack（ラックトレイとラックの一体型タイプ）

16 mm ガラスバイアル（4 ml）x 9 本　または、
15 mm プラスチックバイアル（4 ml）x 9 本
1.5 ml プラスチックバイアル（φ11 mm）x 24 本
7 mm プラスチックバイアル（0.8 ml）x 45 本

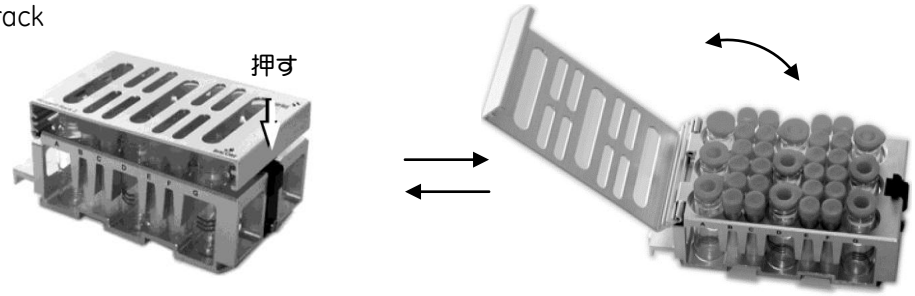
Rack tray

96 well/ 384 well マイクロプレート x 1 枚

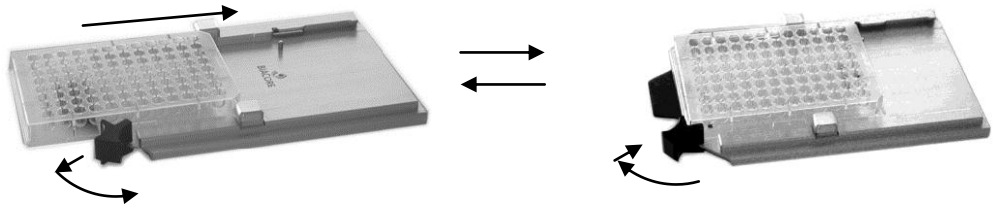
Rubber caps, type 3 BR-1005-02	Rubber caps, type 2 BR-1004-11		Rubber caps, type 5 BR-1006-55
7 mm Plastic Vials BR-1002-12	1.5 ml Plastic Vials BR-1002-87	16 mm Glass Vials BR-1002-09	15 mm Plastic Vials BR-1006-54

補足 1-11. ラックトレイへのバイアルおよびプレートのセット方法

Reagent rack

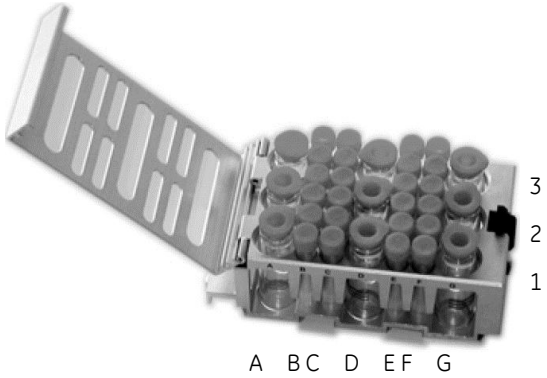


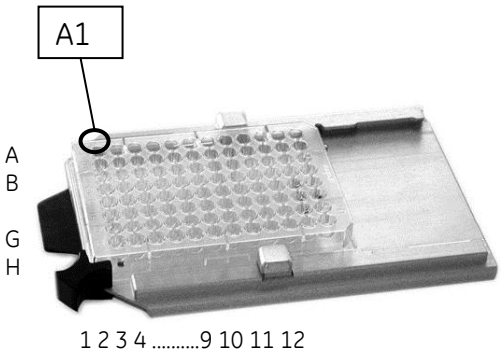
Rack tray



補足 1-12. バイアル位置の指定方法

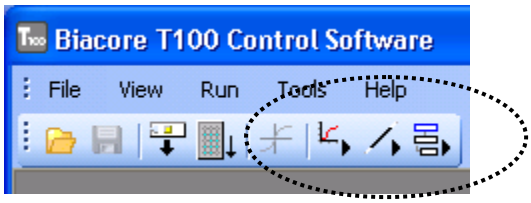
バイアル位置は、ラックトレイ上の座標で指定する。ラックトレイ前面に刻印されている各列“A B C …”の手前から“1 2 3 …”とカウントする。(例.　左手一番手前は、“A1”。その奥は、“A2”。)





2. 基本操作

測定モードには、以下の 3 つのモードがある。測定モードを起動する際には、Toolbar の各アイコンをクリックする。



Manual run

画面上のアイコンを使い測定をおこないながら操作するマニュアルモード。
簡単な試験など、数回の添加で完了する試験をおこなう場合に有効。

Application wizards

ガイダンスに従いながら、実験条件を入力して実行させるオートモード。
リガンド分子の固定化や濃度定量、相互作用解析、サーモダイナミクスなどの実験ごとの専用ウィザードや、pH スカウティングなど実験条件の検討を目的としたウィザードなど汎用性の高い実験項目について対応している。ほとんどの実験は、このモードを使用することで完了する。

Methods

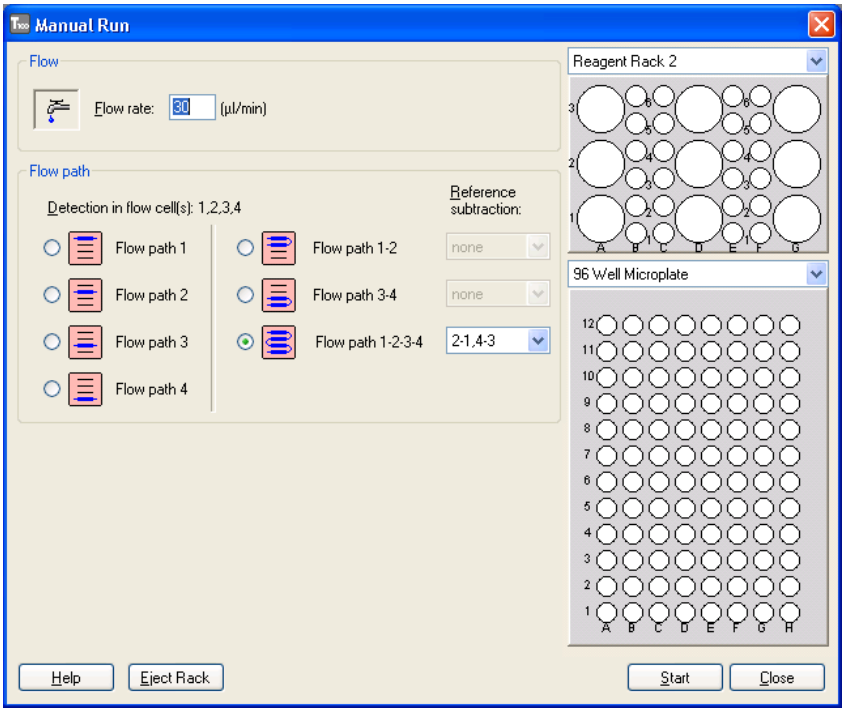
複雑な条件設定や特殊な設定が可能なオートモード。
メソッドビルダー機能によりメソッドを作成する。

ここでは、**Manual run** について説明する。

2-1. マニュアル測定の実行方法

Toolbar の **Start Manual run** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Manual run** をクリックする。

↓

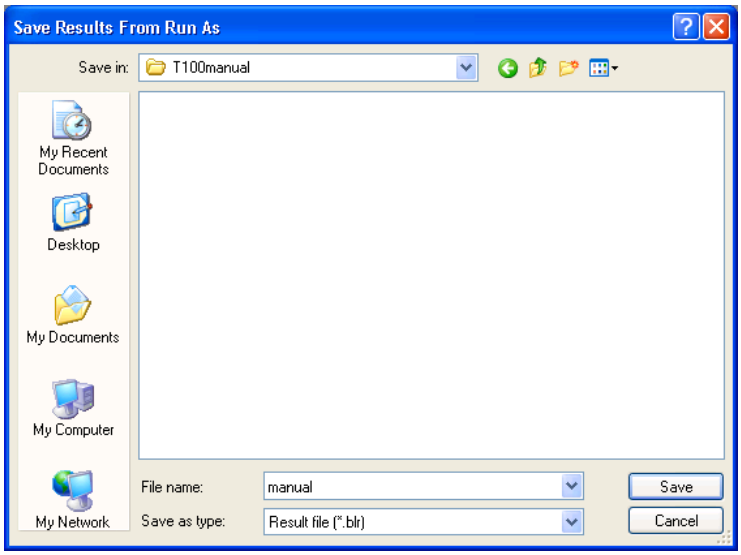


流速（**Flow rate**）を入力する。流速は、1～100 µl/min で設定可能。
検出モード（**Flow path**）を選択する。プルダウンメニューでセットした **Rack** の設定をおこなう。ラックがセットされていない場合、**Start** をクリックしてもエラーメッセージが表示され先に進めない。測定開始後にサンプルをセットする場合でも、ラックを挿入する。
Start をクリックする。

補足 2-1. 試料必要量

試料必要量は、流速（µl/min）と添加時間（s）から計算される試料添加量（µl）に、流路の共洗い分 **28 µl** を加算した量が必要である。平底のバイアルを使用する場合、特殊な添加モードを使用する場合は、必要試料量が異なる。測定開始後にサンプルをセットできるので、添加ダイアログに表示される必要試料量を確認後、試料調製をおこないセットすると間違いがない。

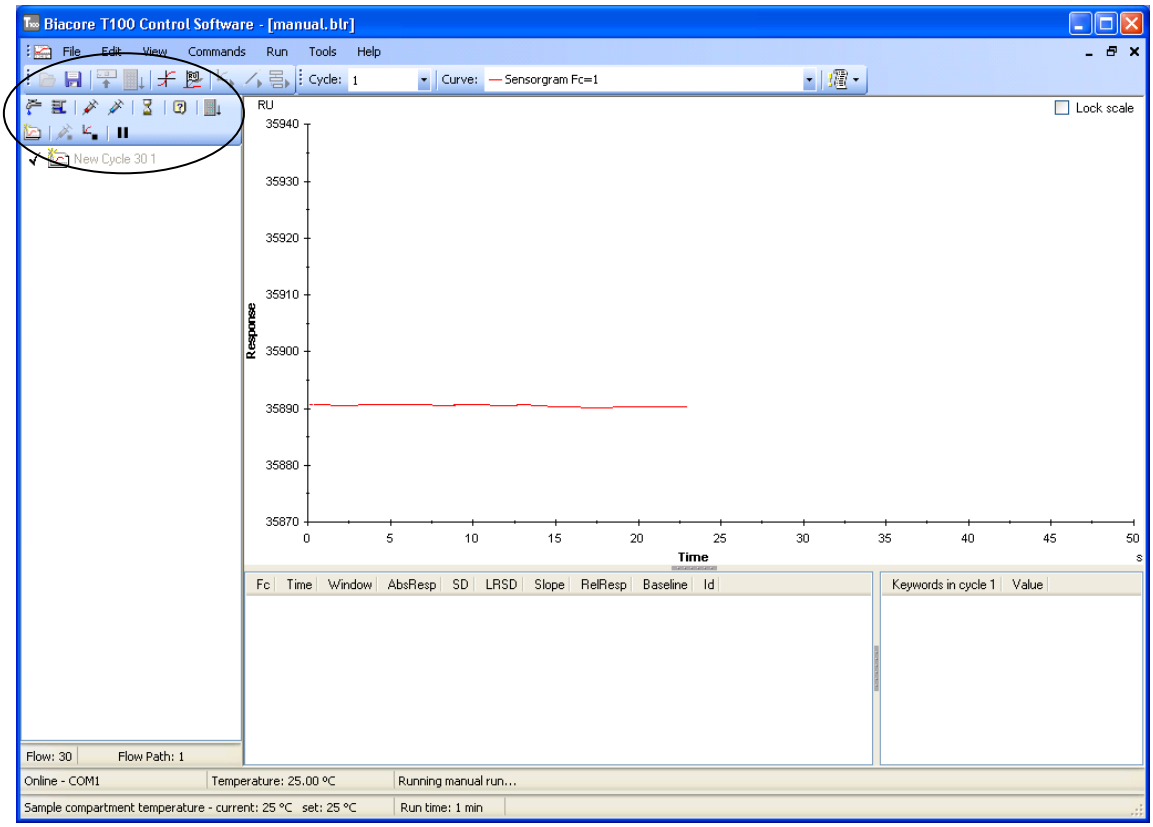
↓



ファイルの保存先を指定する。C:＼Bia Users＼（自分のフォルダ）に移動後、ファイル名を入力して **Save** をクリックする。

↓

センサーグラムが表示され、測定が開始する。



補足 2-2. アイコンの説明

流速の変更

流路の切り替え

赤色　試料の添加、青色　洗浄溶液の添加

待機（次の操作コマンドを実行するまでの時間を任意で設定できる）

ラックの取り出し

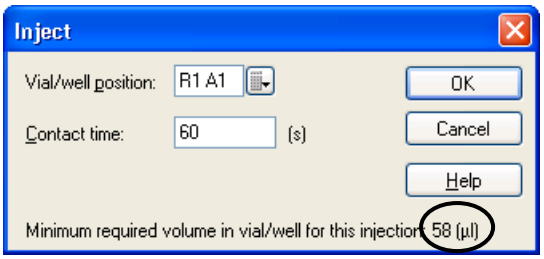
サイクルの切り替え

測定の終了

一時停止

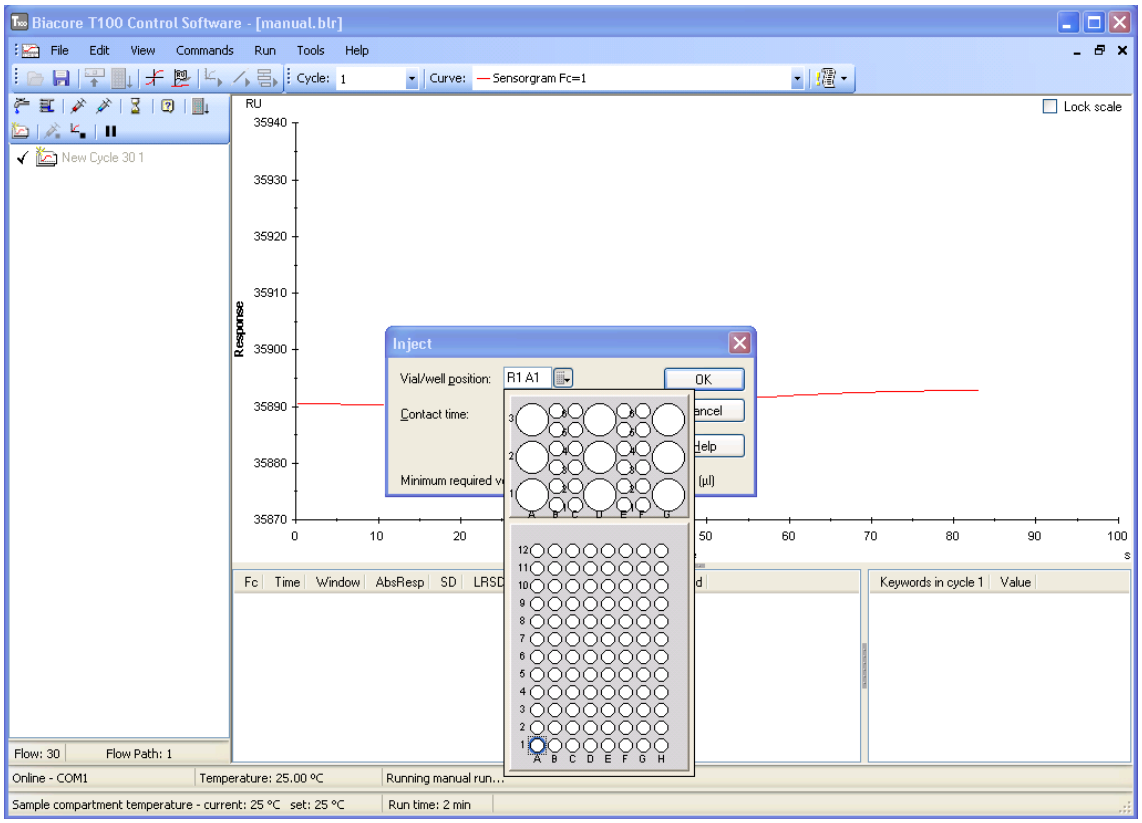
2-1-1. 試料の添加

Inject command アイコン（ ；赤色）または Menu bar の **Commands** → **Inject...**を選択する。



試料の位置（**Vial/well position**）を設定する。この時、試料の位置入力ボックス右のアイコンをクリックするとラックの図上で選択できる。
添加時間（**contact time**）を入力する。位置と添加時間を設定すると、**Inject** ダイアログの右下に必要量が表示される。

↓



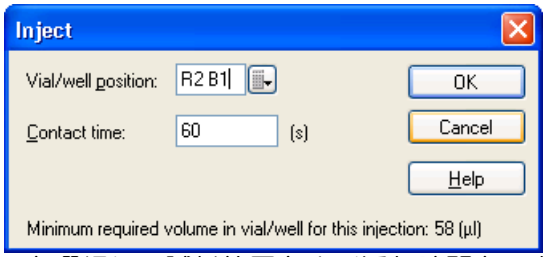
試料をラックにセットする場合は、一旦、**Cancel** をクリックし、**Inject** ダイアログを解除する。

↓

Eject rack tray アイコン（ ）または **Menu bar** の **Commands** → **Eject Rack** を選択する。

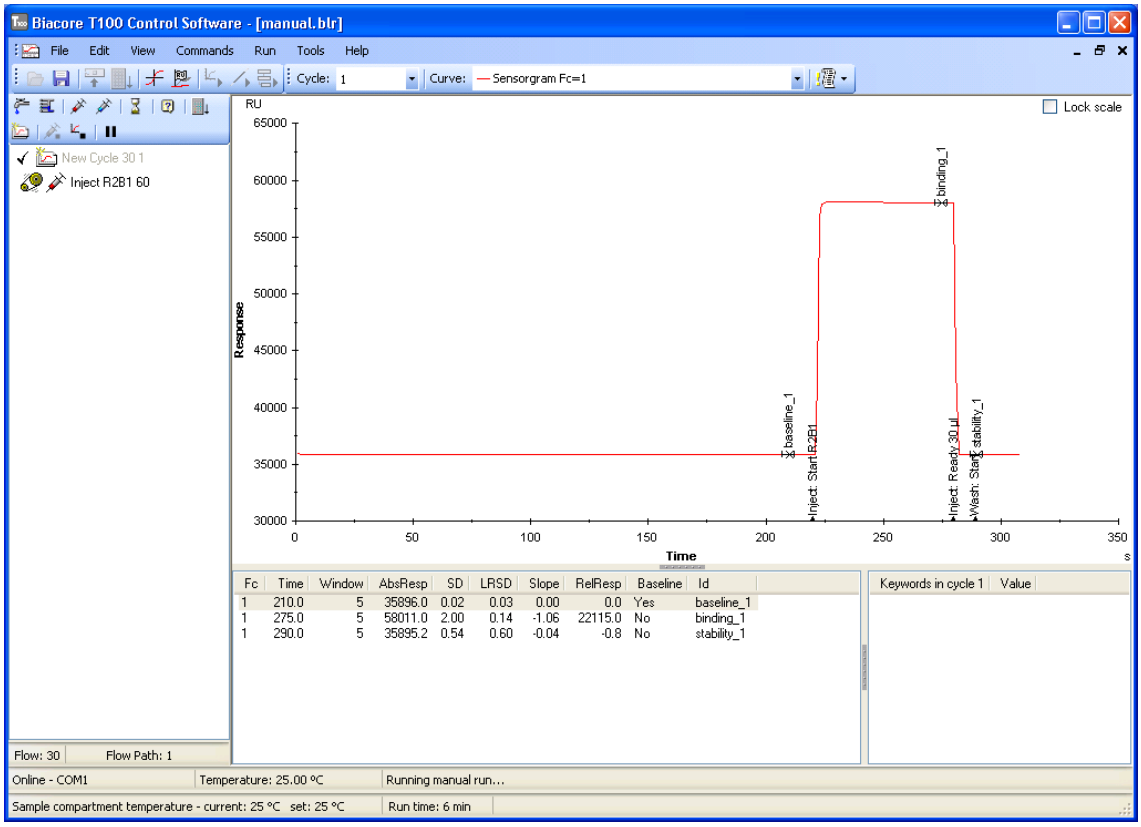
ラックトレイを取り出し、適切な量の試料を分注したバイアルをセットする。ラックトレイを再びシステム本体にセットし **OK** をクリックする。

↓



Inject command アイコンを選択し、試料位置および添加時間を入力する。
OK をクリックする。

↓

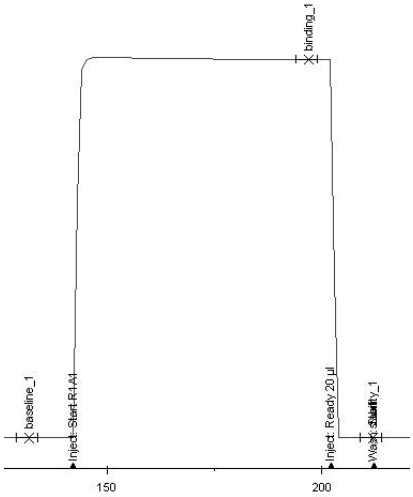

Biacore T100 Control Software - [manual.blr]
File Edit View Commands Run Tools Help
Cycle: 1
Curve: Sensorgram Fc=1
New Cycle 30 1
Inject R2B1 60
RU
Lock scale
Response
Time
binding_1
baseline_1
Inject: Start R2B1
Inject: Ready 30 µl
Wash: Start stability_1
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
1 210.0 5 35896.0 0.02 0.03 0.00 0.0 Yes baseline_1
1 275.0 5 58011.0 2.00 0.14 -1.06 22115.0 No binding_1
1 290.0 5 35895.2 0.54 0.60 -0.04 -0.8 No stability_1
Keywords in cycle 1 Value
Flow: 30 Flow Path: 1
Online - COM1 Temperature: 25.00 °C Running manual run...
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C Run time: 6 min

必要に応じ、引き続き試料を添加する。

2-1-2. レポートポイントの追加

レポートポイントとは、センサーグラムの任意の時間におけるレスポンス（RU）を、レポートポイントテーブルに表示させる機能をいう。試料添加をおこなった場合には、その都度自動的にレポートポイントが取得される。自動取得したレポートポイント以外にも、任意の時間で幾つも追加することができる。

補足 2-3. 自動取得されるレポートポイント



レポートポイントテーブル

Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
1	132.0	5	36881.6	0.09	0.10	0.00	0.0	Yes	baseline_1
1	197.0	5	59602.6	2.58	0.23	-1.38	22721.0	No	binding_1
1	212.0	5	36879.7	0.16	0.14	-0.05	-1.9	No	stability_1

Id（レポートポイント名）

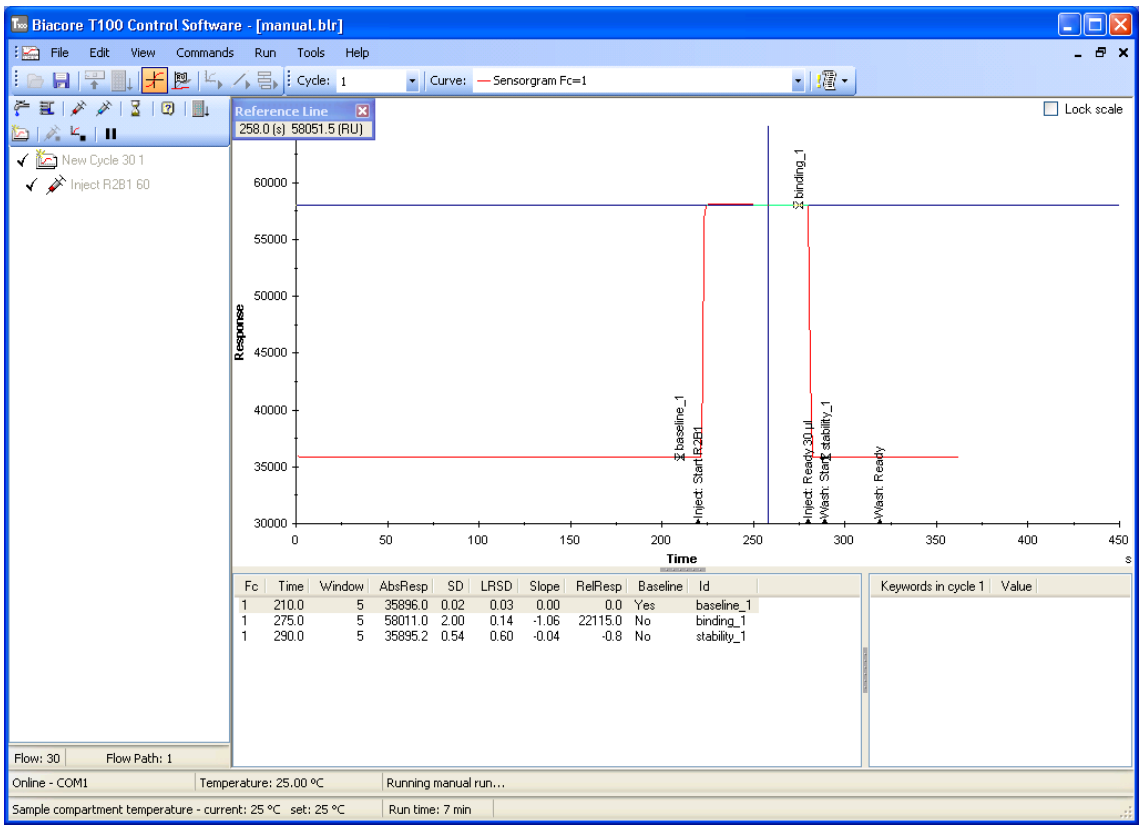
baseline_1	添加開始 10 秒前
binding _1	添加終了 5 秒前
stability _1	添加終了 10 秒後

“baseline_1”のセンサーグラムの高さ（RU）は “0（ゼロ）RU”（RelResp 0.0）に自動設定される。“binding_1”もしくは“stability_1”の RelResp は、“baseline_1”からの相対値（RU）を示している。

2 つ目の試料添加時のレポートポイント名は、“baseline_2”“binding_2” “stability_2”となる。RelResp は、“baseline_2”からの相対値（RU）となる。

Toolbar の **Reference line** アイコン（ ）または Menu bar の **View** → **Reference Line** をクリックして、センサーグラム上にリファレンスラインを表示する。

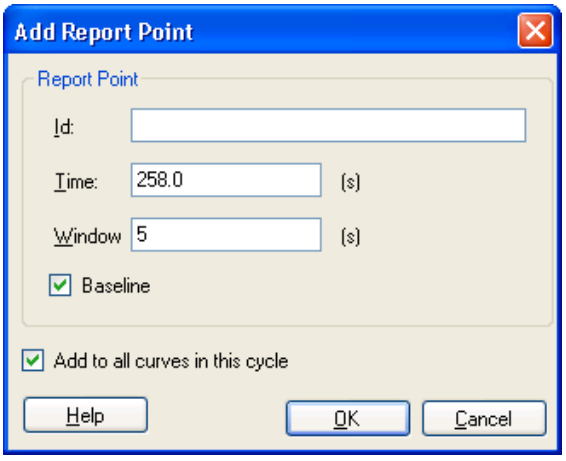
↓



マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線にあわせ、任意の時間までドラッグする。または、任意の時間上のセンサーグラムをクリックし、リファレンスラインを移動する。

↓

Toolbar の **Add Report point** アイコン（ ）または Menu bar の **Edit** → **Report point** をクリックする。



Id にコメントを入力する。相対値 0（ベースライン）として設定する場合は **Baseline** をチェックする。**OK** をクリックすると、レポートポイントが追加される。

2-1-3. 測定の終了

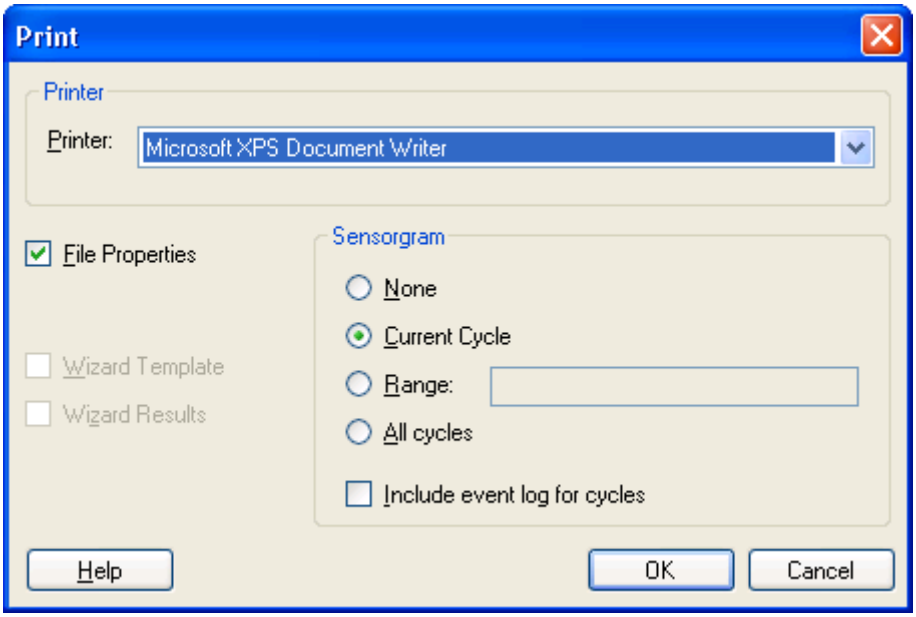
試料添加終了後、**End Manual run** アイコン（ ）または **Menu bar** の **Commands** → **End Run** をクリックする。装置は自動的に **Standby flow** 状態になる。

2-2. ファイルの保存

得られたセンサーグラムは測定終了時に自動保存される。
追加したレポートポイントを保存するには、Menu bar の **File** → **Save** をクリックする。

2-3. データの印刷

File → **Print…**をクリックする。印刷したい項目にチェックを入れ、**OK** をクリックする。



File Properties	ファイルプロパティ
Wizard Template または Method	測定内容（画面は Method になっているが、使用したプログラムによって表示が変わる。）
Wizard Results または Sensorgram	測定結果 Current Cycle・・・表示されているセンサーグラム Range・・・複数サイクル存在する場合の必要な部分のセンサーグラム All cycles・・・すべてのセンサーグラムの印刷を意味する
Include event log for cycles	イベントログ

3. 固定化

リガンド

相互作用を検討する分子のうち、固定化する分子を**リガンド**という。リガンドの精製度は、結合特異性の判定やアナライトの結合許容量に大きく影響する。90%以上の精製度のリガンドを使用する。

各種固定化方法

センサーチップ CM5 に化学結合で固定化する代表的な方法を記載する。詳細およびその他の固定化方法については、“生体分子相互作用解析 攻略ガイド”を参照。

アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジン ε -アミノ基）を利用して固定化する方法。CM（カルボキシメチル）デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、リガンドを固定化する。固定化後、残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。

リガンドチオールカップリング法

リガンドの表面に存在する遊離型チオール基を用いて-S-S-結合で固定化する方法。

サーフェスチオールカップリング法

センサー表面にチオール基を導入し、リガンドのカルボキシル基を介して-S-S-結合で固定化する方法。

アルデヒドカップリング法

大量の糖鎖を持つムチンタンパク質等の糖を利用して固定化をする方法。糖鎖の非還元末端をメタ過ヨウ素酸により開裂させアルデヒド基を作成して、ヒドラジンによりヒドラジノ基を導入したセンサーチップにシッフ塩基で固定化する。

固定化量

実験の目的によって調節する必要がある。

特異的結合の有無の判定、スクリーニング

アナライトの結合レスポンスが十分得られる固定化量が必要となる。固定化量の下限として、理論的最大結合量 R_{max}（固定化したリガンドにアナライトが最大量結合したときのレスポンス）が、最低でも **20RU** は必要である。理論的な最大結合量は、以下の式で算出することができる。

アナライトの最大結合レスポンス（理論的最大結合量 R_{max}）
=アナライトの分子量 x リガンドの固定化量 /リガンドの分子量 x S
（Da）　（RU）　（Da）
S はリガンドのアナライト結合部位数

（例）

リガンドの分子量	50,000 Da
リガンド固定化量	1,000 RU
リガンド結合部位数	1
アナライト分子量	20,000 Da
理論的最大結合量（R_{max}）	= 20,000 x 1,000 / 50,000 x 1 = 400 RU

濃度測定

固定化量はできるだけ多くする。目安として、タンパク質リガンドの場合、10,000RU 以上固定化する。固定化量を多くすると既知濃度アナライト測定時に得られる結合レスポンス RU vs C（濃度）をプロットした検量線の直線性が高くなる。

反応速度定数（k_a,k_d）、解離定数（K_D）の算出

固定化量はできるだけ抑える。マストランスポートリミテーション（固定化量が多いことにより、アナライトの供給が追いつかない現象）を抑制するためである。至適固定化量は、以下の式から算出される最大と最小の固定化量（RU）の範囲となる。

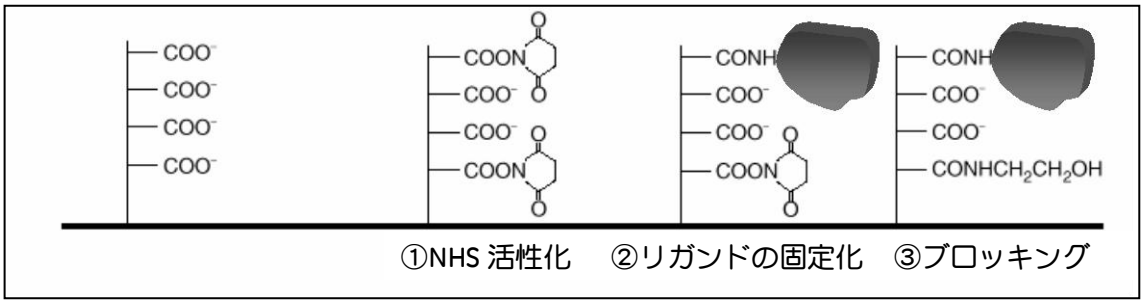
最小固定化量（RU）
40 x 1/S x （リガンドの分子量／アナライトの分子量）
最大固定化量（RU）
200 x 1/S x （リガンドの分子量／アナライトの分子量）
S はリガンドのアナライト結合部位数

（例）

リガンドの分子量	50 kDa
アナライトの分子量	100 kDa
リガンド結合価数	1
最小固定化量	40 x 1/1 x（50,000/100,000） ＝ 20 RU
最大固定化量	200 x 1/1 x（50,000/100,000） ＝ 100 RU
至適固定化量範囲	20～100RU

3-1. アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジン ε -アミノ基）を利用して固定化する。CM デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、至適な緩衝液で希釈したリガンドを固定化する。残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。



①NHS 活性化　②リガンドの固定化　③ブロッキング

準備するもの

アミンカップリングキット（BR-1000-50）

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれている。

EDC （N-ethyl-N'-（3-dimethylaminopropyl）carbodiimide hydrochloride）

NHS （N-hydroxysuccinimide）

1 M ethanolamine hydrochloride 溶液 （pH 8.5）

キットに添付されている説明書に従い、EDC および NHS はそれぞれ 10 ml の超純水に溶解する。ただちに 200 µl ずつを 7 mm プラスチックバイアルにそれぞれ分注し、ラバーキャップをして使用直前まで-20 ℃で冷凍保存する。使用直前に 1 組ずつの試薬を取り出して、融解させて使用する。融解後、試薬の再凍結はできない。エタノールアミンは、溶液で供給されるので冷蔵（4 ℃）保存する。200 µl ずつ小分けしておくか、使用する直前に分注する。

ランニング緩衝液

1 級アミンを含まない緩衝液。（トリスやグリシン緩衝液は避ける。）

リガンド

アジ化ナトリウム等の求核性物質を含まないもの。リガンドの安定化目的のために混入されている BSA（ウシ血清アルブミン）等のタンパク質類はあらかじめ除去する。

リガンド希釈液

10 mM 酢酸緩衝液もしくは、10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）

リガンドの調製

リガンドがタンパク質の場合

濃度は 5～200 µg/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸緩衝液で希釈する。酢酸緩衝液の pH はリガンドの等電点より 0.5～2 低い pH を使用する。希釈用緩衝液として pH 3.5 以下のものは使用しない。

等電点が不明な場合は、固定化前に、あらかじめ、27 ページに示したウィザードの Immobilization pH Scouting により至適な 10 mM 酢酸緩衝液の pH を検討する。

濃縮効果が確認できない酸性タンパク質の場合は、サーフェスチオールカップリングもしくはリガンドをビオチン化後、センサーチップ SA に固定化する方法を検討する。

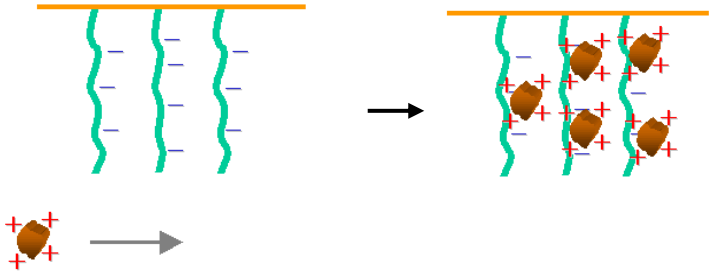
リガンドがペプチドや低分子物質の場合

100 µg/ml 以上の高濃度のリガンドを使用し、弱アルカリ性条件 10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液 (pH 8.5) で希釈する。活性型 NHS 基とアミノ基との反応効率は、pH 8.5 前後がもっとも高い。

溶解性が低い低分子化合物を固定化する際には、DMSO などの有機溶媒存在下で固定化を実施する。有機溶媒を利用する際には、化学耐性を英語版マニュアル（Instrument handbook）で確認する。

3-1-1. リガンド希釈液の pH 選択

センサーチップ CM5 表面にコーティングされている直鎖デキストランにはカルボキシル基が導入されているため、表面は負に荷電している。リガンドを正に荷電した状態で添加すると、負に荷電している CM デキストランとの間に静電気的な結合が生じ、リガンドを CM デキストラン中に濃縮することができる。この条件を用いることで低濃度のリガンドをセンサーチップ表面に高濃度で供給でき、効率よく固定化できる。



等電点が既知のリガンドの場合

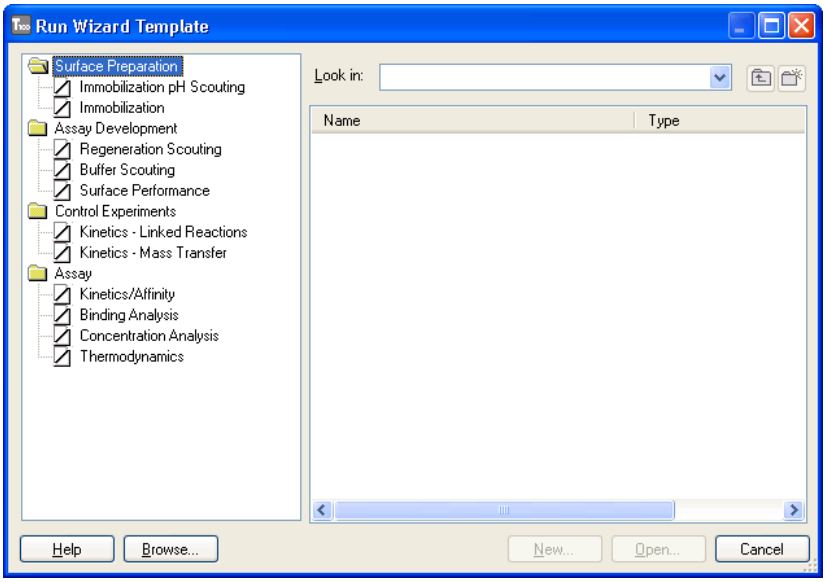
等電点よりも 0.5 以上低い pH を使用する。ただし、等電点が既知の場合であっても、高次構造の状態などにより、濃縮される pH が予想外に異なることもあるため、固定化前に、ウィザードの **Immobilization pH Scouting** により確認することをお奨めする。

等電点が不明な場合

ウィザードの **Immobilization pH Scouting** を実行し、希釈液の pH を検討する。この操作は、何も処理していないフローセル（固定化実施予定のセル）を使用して、各 pH におけるセンサー表面へのリガンドの濃縮度合いを評価する。この検討で、リガンドは固定化されない。検討後、引き続き、そのセルに固定化をおこなう。

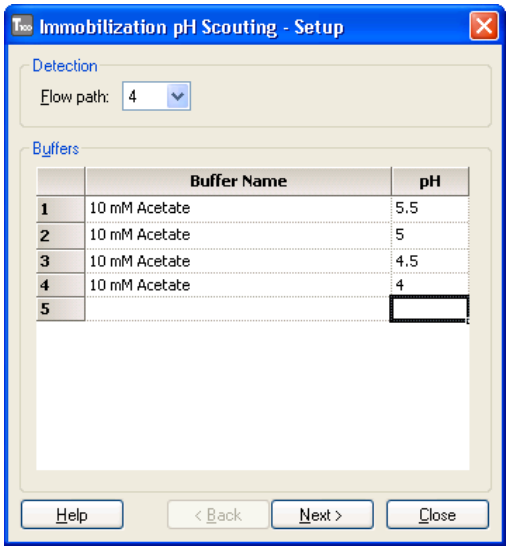
リガンドは終濃度 5～200 µg/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸緩衝液で希釈する。**Immobilization pH Scouting** では、リガンド添加終了後、ランニング緩衝液に置換されると、通常は静電的に結合したリガンドはセンサーチップ表面から速やかに解離する。しかし、稀に、リガンドがデキストランに非特異的吸着を起こすため、リガンド添加終了後、洗浄溶液（50 mM NaOH）を添加し、吸着したリガンドの洗浄をおこなう操作が組み込まれている。

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。



Surface Preparation → **Immobilization pH Scouting** を選択し、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

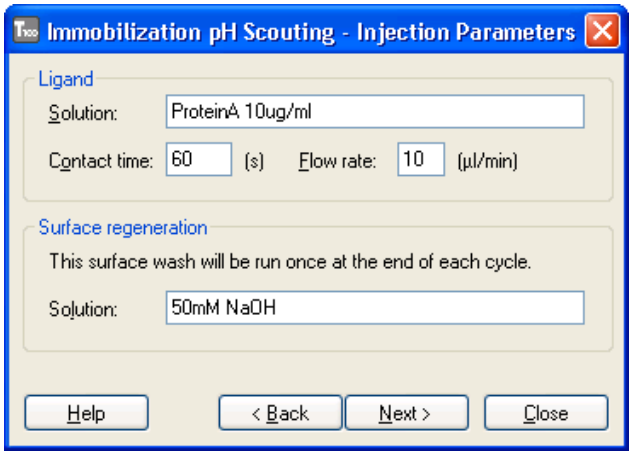
↓



条件検討をおこなう **Flow path** を選択する。固定化予定セルを選択し（偶数セルを選択する）、リガンド希釈液を入力する。（デフォルトの変更も可能。）

Next > をクリックする。

↓



Ligand

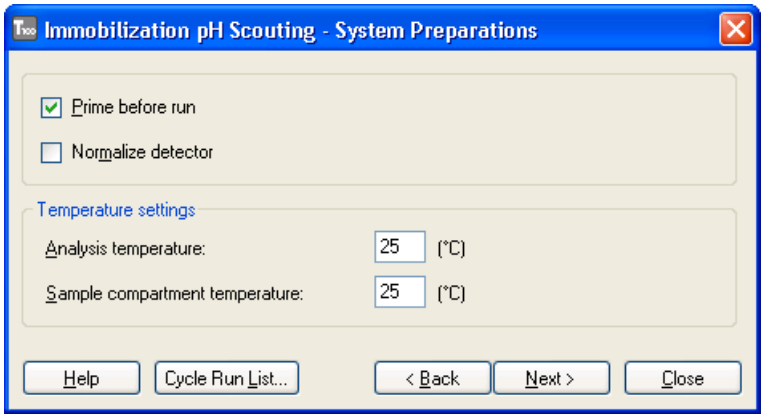
Solution	リガンドの名称	
contact time	添加時間（s）	通常は 60 s に変更
Flow rate	流速（µl /min）	10µl/min

Surface regeneration

Solution	リガンド添加終了後のチップ表面の洗浄溶液（50 mM NaOH）	

各項目に情報を入力後、**Next >**をクリックする。

↓



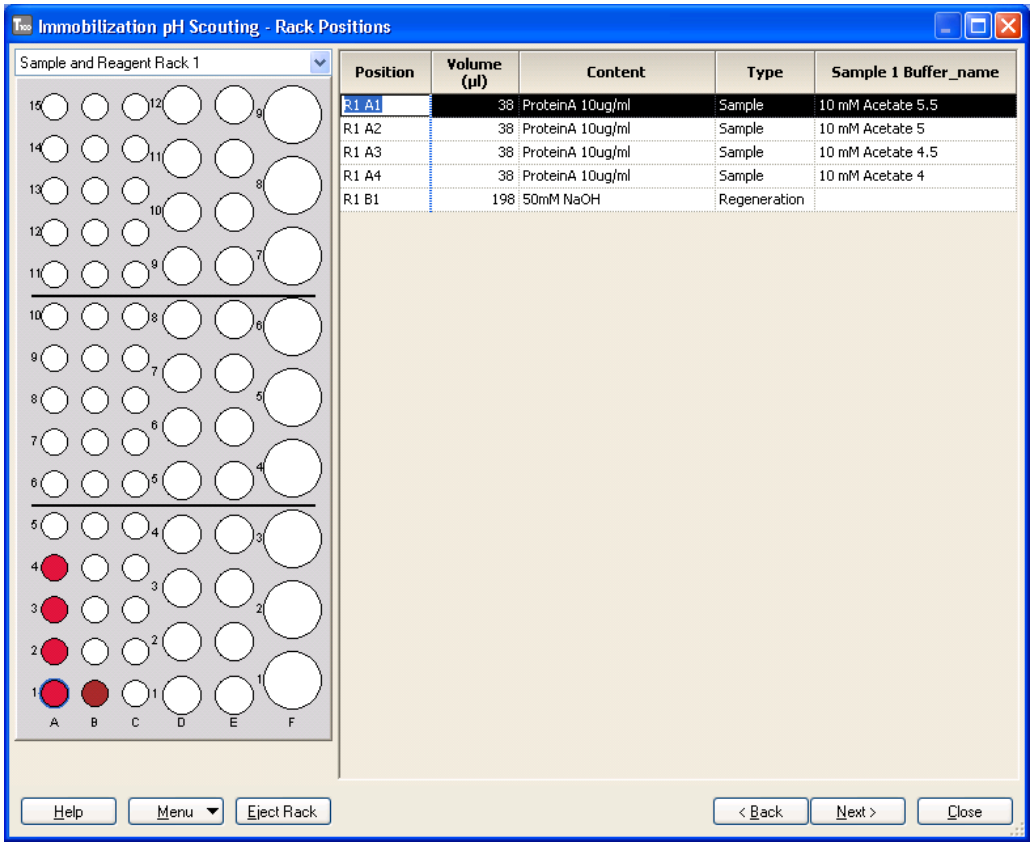
固定化操作を始める前に、**Prime** および **Normalize** をおこなう設定ができる。

Temperature settings

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

入力後、**Next>**をクリックする。

↓


Immobilization pH Scouting - Rack Positions
Sample and Reagent Rack 1
Position
Volume (µl)
Content
Type
Sample 1 Buffer_name
R1 A1 38 ProteinA 10ug/ml Sample 10 mM Acetate 5.5
R1 A2 38 ProteinA 10ug/ml Sample 10 mM Acetate 5
R1 A3 38 ProteinA 10ug/ml Sample 10 mM Acetate 4.5
R1 A4 38 ProteinA 10ug/ml Sample 10 mM Acetate 4
R1 B1 198 50mM NaOH Regeneration
Help
Menu
Eject Rack
< Back
Next >
Close

右側の表で試薬の位置と必要量（µl）を確認する。表をクリックすると対応する左側のラック上のバイアル位置が強調表示になる。位置と必要量（µl）を確認しながら、調製したリガンド、試薬バイアルをラックにセットする。

↓

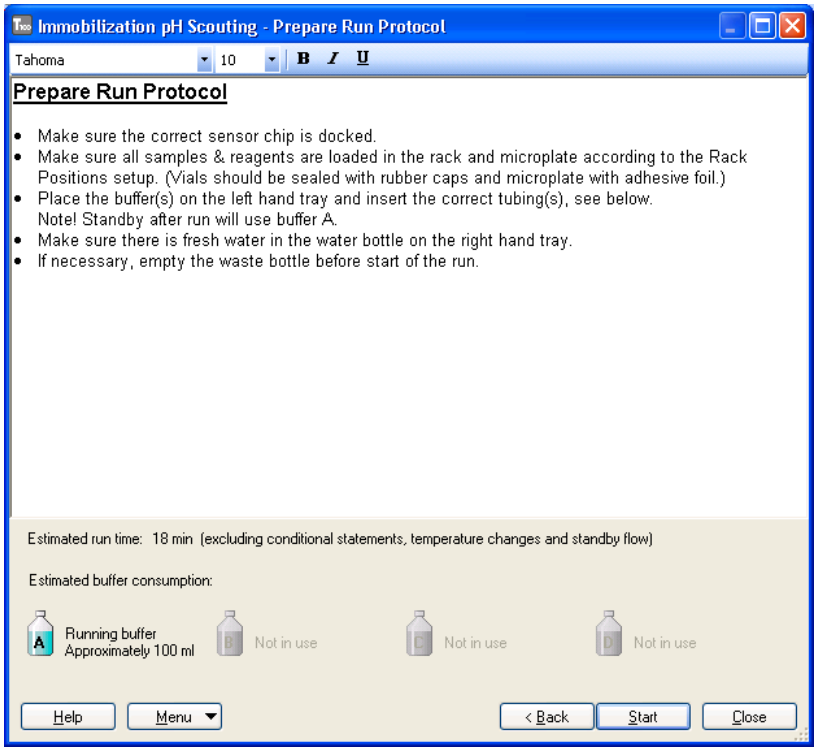
Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックする。

↓

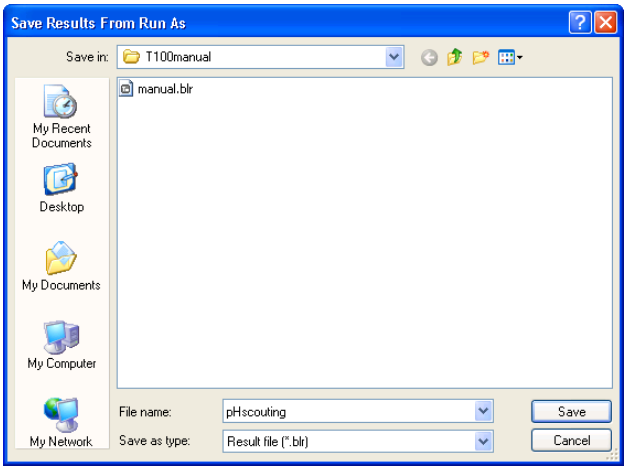

Immobilization pH Scouting - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 18 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
Approximately 100 ml
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液の量が表示される。
Start をクリックする。

↓

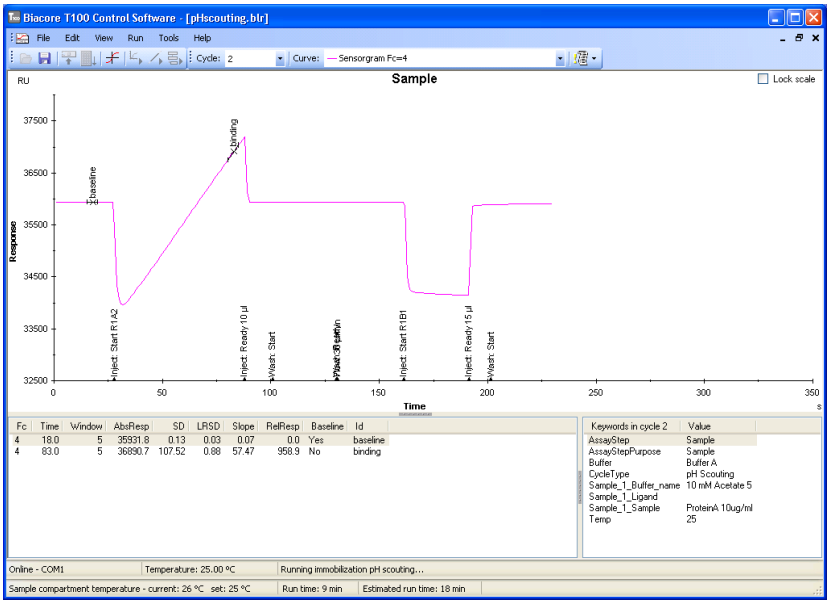
設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



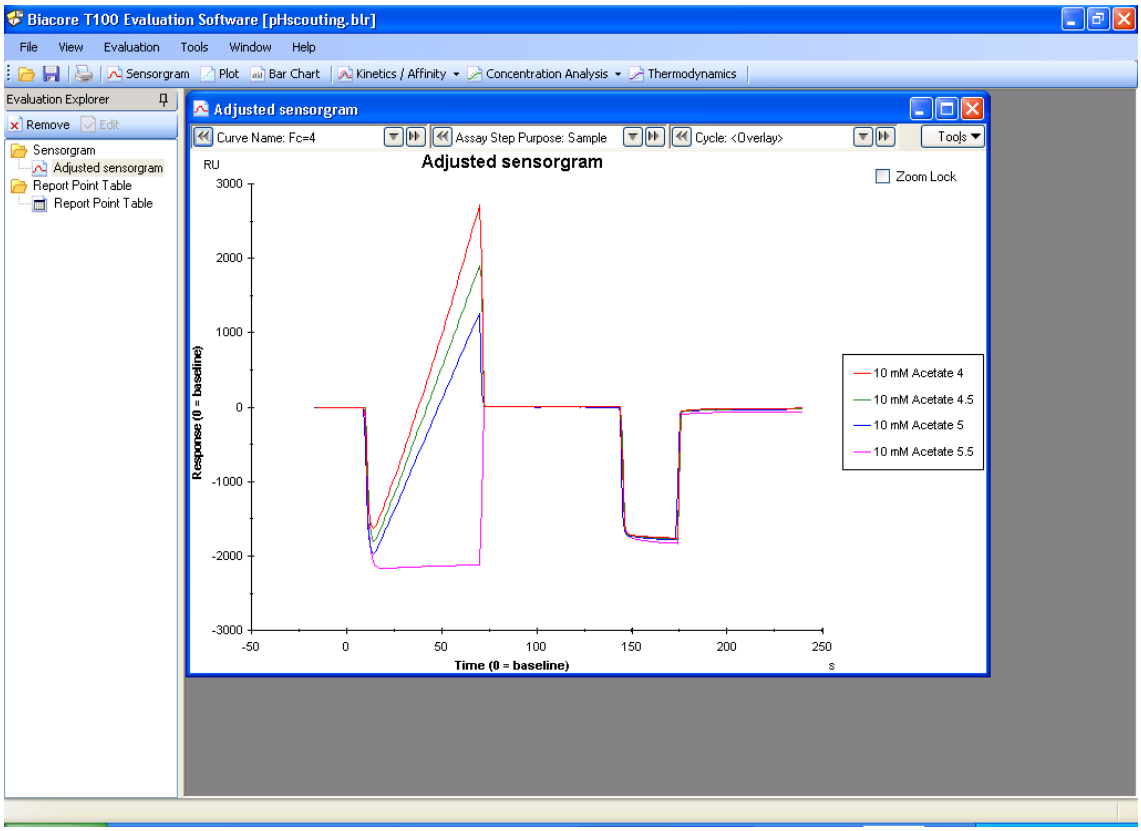
Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** をクリックすると測定が開始する。

↓



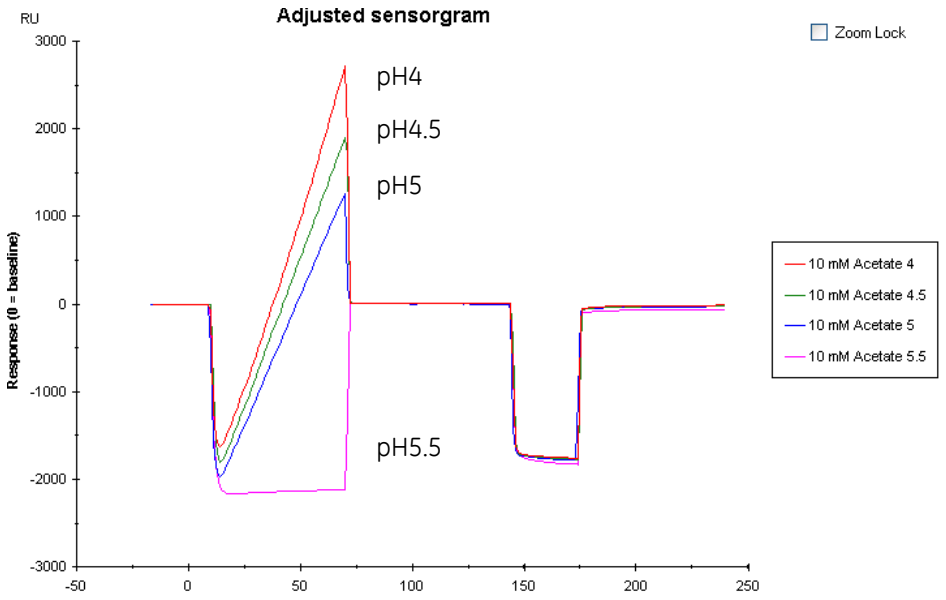
Immobilization pH Scouting 終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各 pH の測定結果が重ね書き表示される。(Control Software 上の測定データは入力したファイル名で自動保存されている。)

↓



センサーグラムより、濃縮効果が確認できるもっとも高い pH を固定化条件として採用する。

補足 3-1. Immobilization pH Scouting の評価



濃縮効果が確認できるもっとも高い pH を固定化条件として採用する。

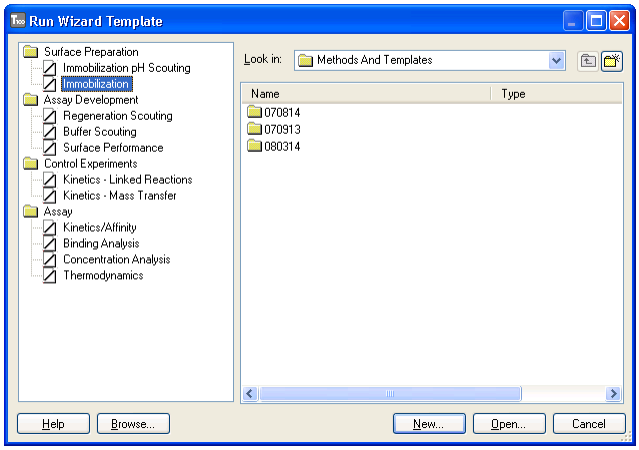
上記結果では、pH4 がもっとも濃縮効果が高いが、pH が低いほど、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は低下する（活性化 NHS 基とアミノ基の至適反応条件は pH8.5）。また、タンパク質の安定性は一般的に中性に近い程安定である。pH を変化させても、濃縮効果（添加時の傾き）に極端な差がない場合は、pH が高い条件を選択するのが望ましい。

上記結果では、pH5 を選択する。

なお、Immobilization pH Scouting における濃縮レベル以上の固定化は困難である。確認した濃縮レベル（RU）よりもっと多くの固定化量を望む場合は、リガンド濃度を上げて（例 100 µg/ml 等）、再度 Immobilization pH Scouting を実施し濃縮レベルを確認する。

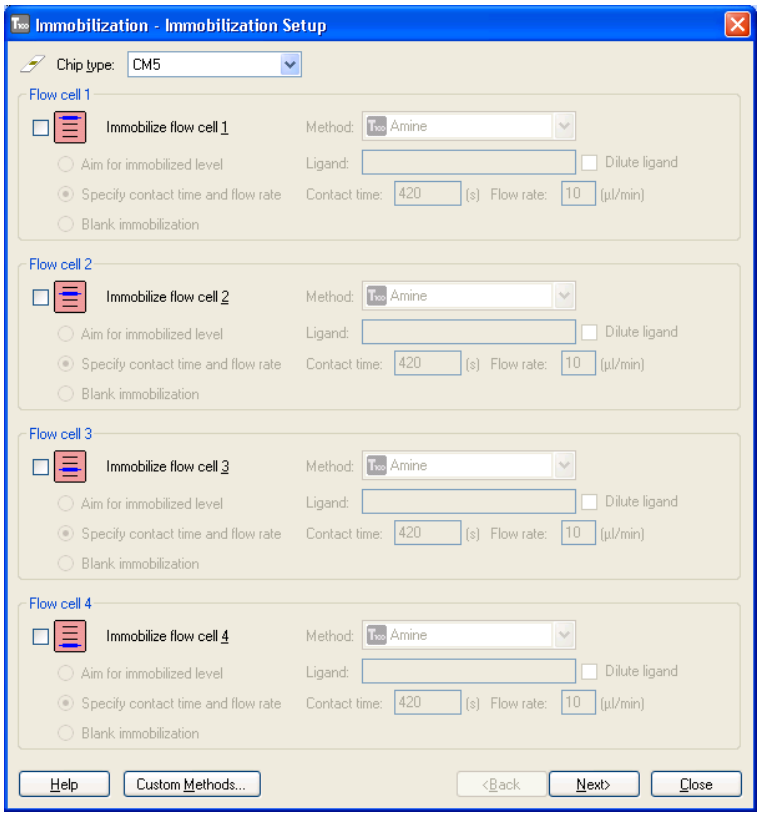
3-1-2. 基本プロトコールでの固定化

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。

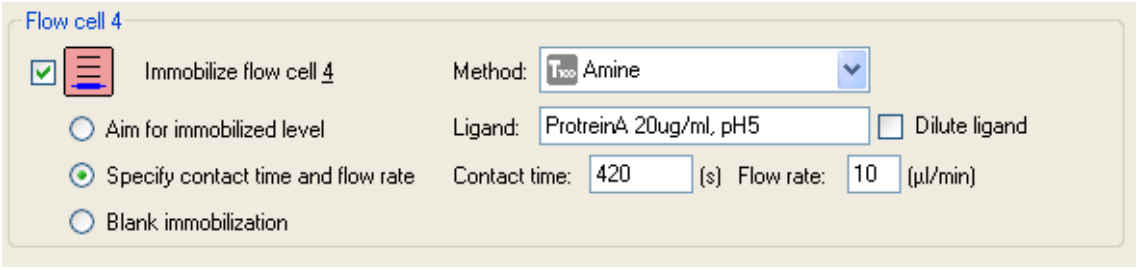


Surface Preparation → **Immobilization** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



Chip type のプルダウンメニューで、使用するセンサーチップ（**CM5**）を選択する。



固定化する **Flow cell** にチェックを入れる。固定化は偶数セルを選択するのが望ましい。

Method　　固定化方法。**Amine** を選択

Ligand　　リガンドの名称

標準プロトコールでは、NHS 活性化とブロッキングは流速 10 µl/min、添加 7 分間と固定化されている。リガンドの添加条件については、以下の項目から選択する。

Aim for immobilized level

リガンドの固定化量を調節して固定化。

Specify contact time and flow rate

リガンドの添加時間と流速を指定し固定化。

Blank Immobilization

リガンドの添加なし。NHS 活性化後エタノールアミンでブロッキングしたリファレンスセルを作成。

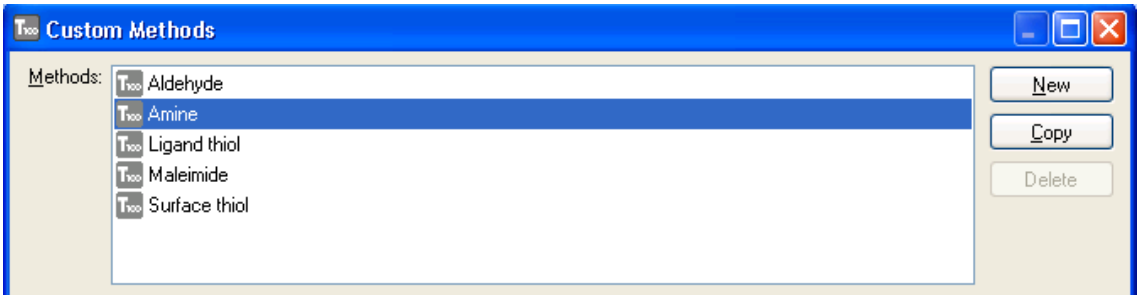
ここでは、Specify contact time and flow rate を選択し、標準的な条件、添加時間 420（s）、流速 10（µl/min）を入力する。**Next >**をクリックする。

↓

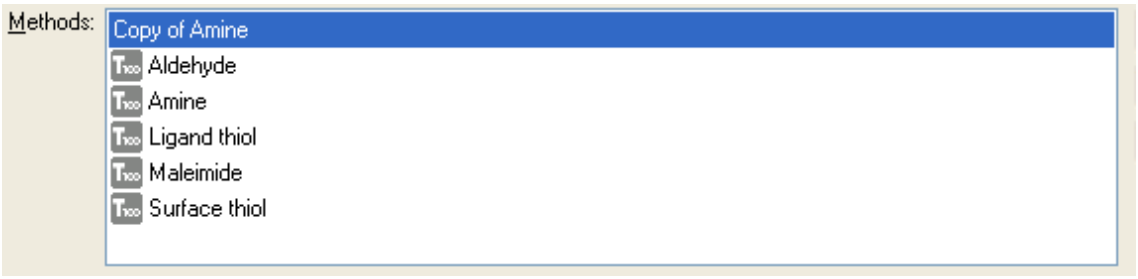
補足 3-2. 標準プロトコールの変更

Specify contact time and flow rate は、活性化時間およびブロッキング時間は 7 分間と指定されている。固定化量を多くする目的で、添加時間を長くしたいなど、既存のメソッドを変更する場合は、画面左下の **Custom Methods...**をクリックする。

画面上部に既存のメソッドが表示されている。**Amine** をクリックし、ハイライトにする。

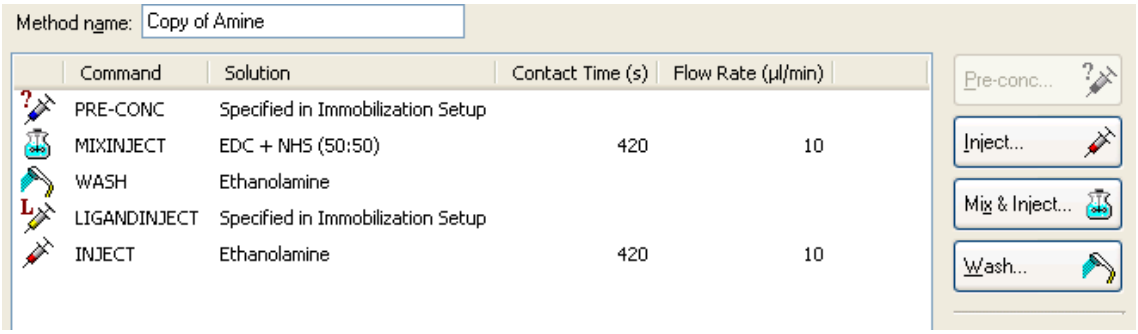


画面右上の **Copy** をクリックする。



Methods:に、コピーしたメソッドが追加される。

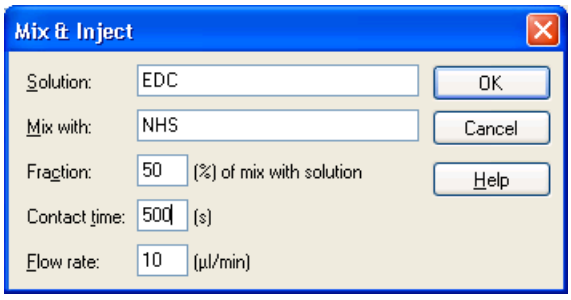
↓



コピーしたメソッドを元に、各項目の条件を変更することができる。変更したいコマンドをダブルクリックするか、またはクリックして **Edit...**をクリックする。

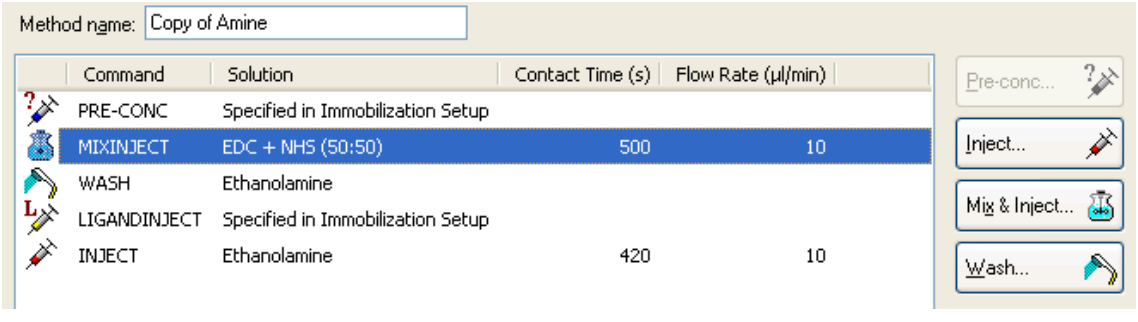
↓

（例）EDC/NHS の項目

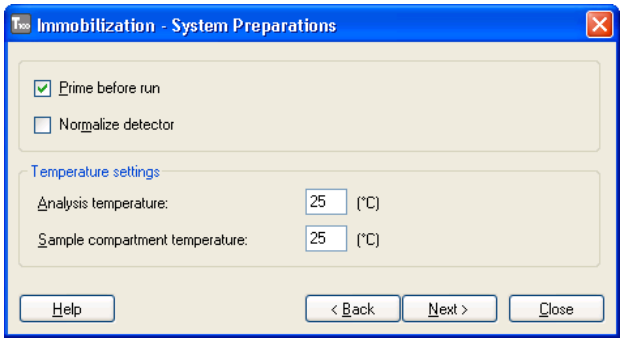


必要に応じて流速および添加時間を変更後、**OK** をクリックする。

↓



変更後、**OK** をクリックする。



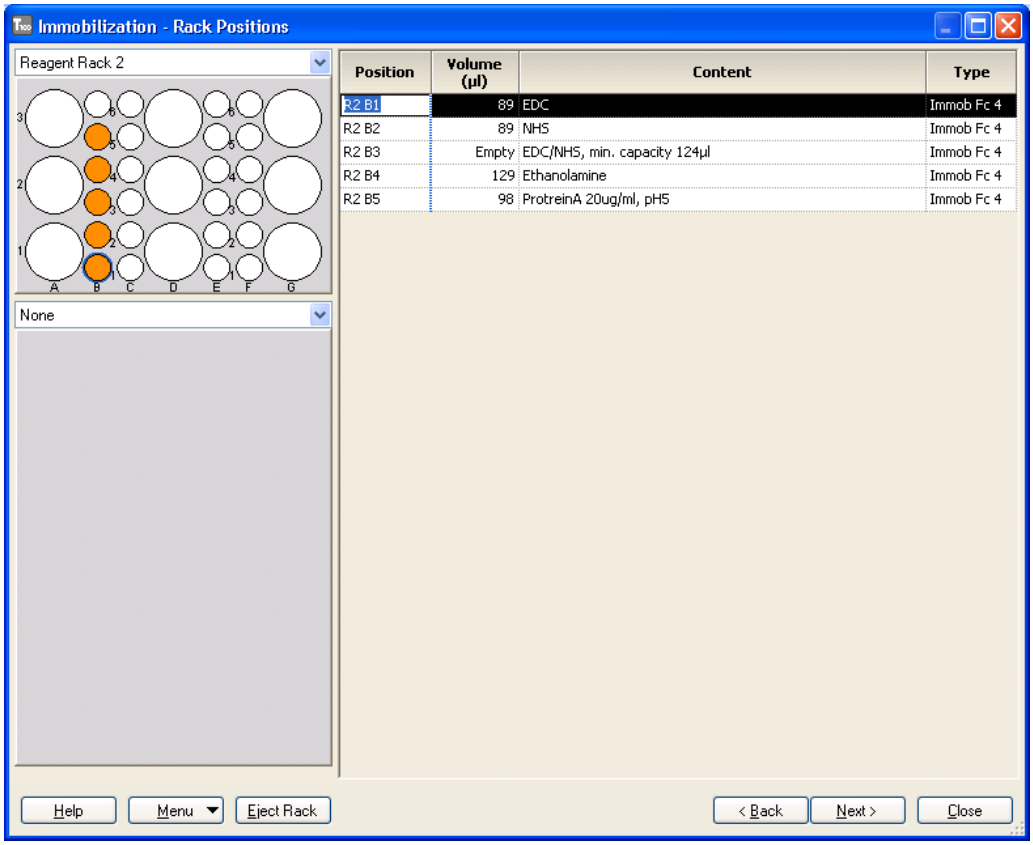
固定化操作を始める前に、自動で **Prime** および **Normalize** をおこなう設定ができる。

Temperature settings

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

Next >をクリックする。

↓



右側の表で試薬の位置と必要量（µl）を確認する。表をクリックすると対応する左側のラック上のバイアル位置が強調表示になる。位置と必要量を確認しながらバイアルをラックにセットする。

EDC	89 µl/ 7 mm プラスチックバイアル
NHS	89 µl/ 7 mm プラスチックバイアル
空（NHS/EDC 混合用）	空/ 7 mm プラスチックバイアル
Ethanolamine	129 µl/ 7 mm プラスチックバイアル
Ligand	98 µl/ 7 mm プラスチックバイアル

固定化時間・流速を変更した場合には必要量が変わる

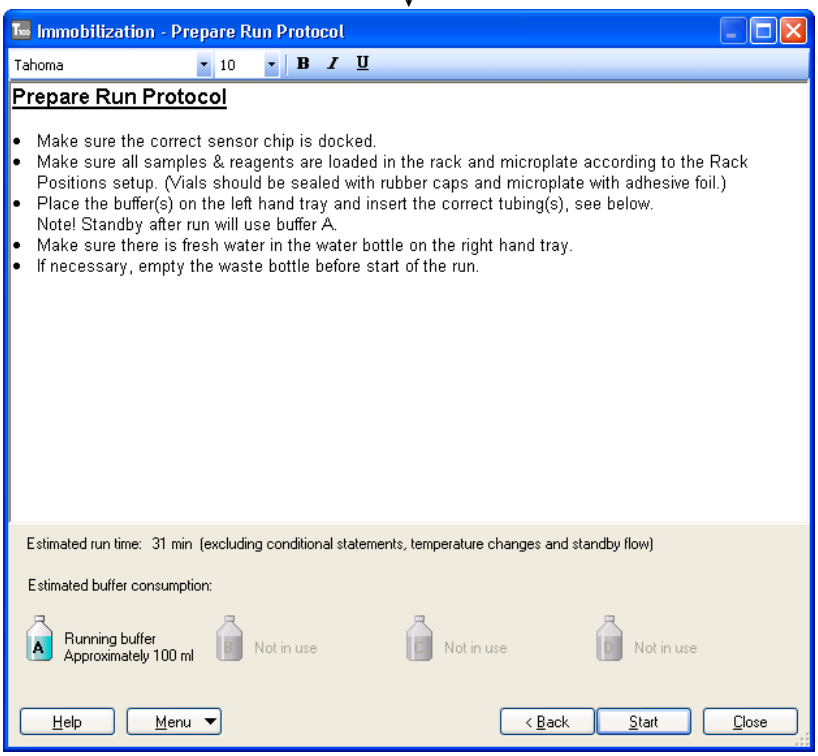
↓

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入して **OK** をクリックする。**Eject Rack Tray** ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックする。

↓


Immobilization - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 31 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
A
Running buffer
Approximately 100 ml
B
Not in use
C
Not in use
D
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、固定化時間、必要なランニング緩衝液量が表示される。
Start をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測

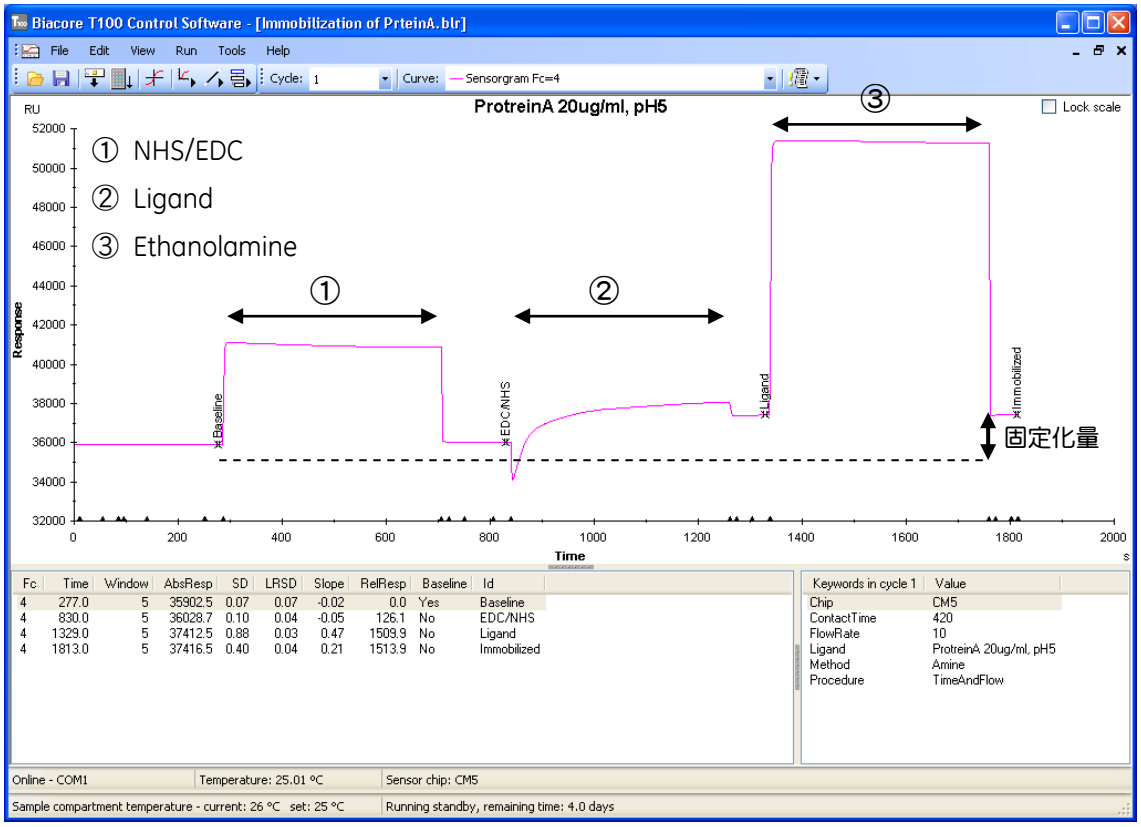
定がスタートする。

↓

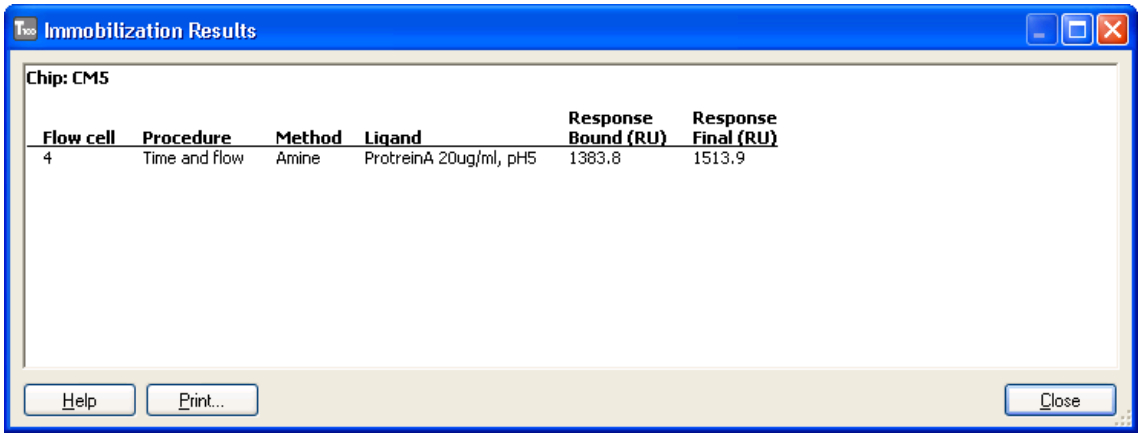
固定化終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。測定データは入力したファイル名で自動に保存される。

補足 3-3. 緊急停止

測定開始後、プログラムを緊急停止したい場合には、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。



固定化量（Response Final）（RU）が別途表示される。



補足 3-4. 固定化量の確認

固定化量として Response Bound と Final の 2 種類が表示される。

Bound　リガンド添加前後のセンサーグラムの高さの差

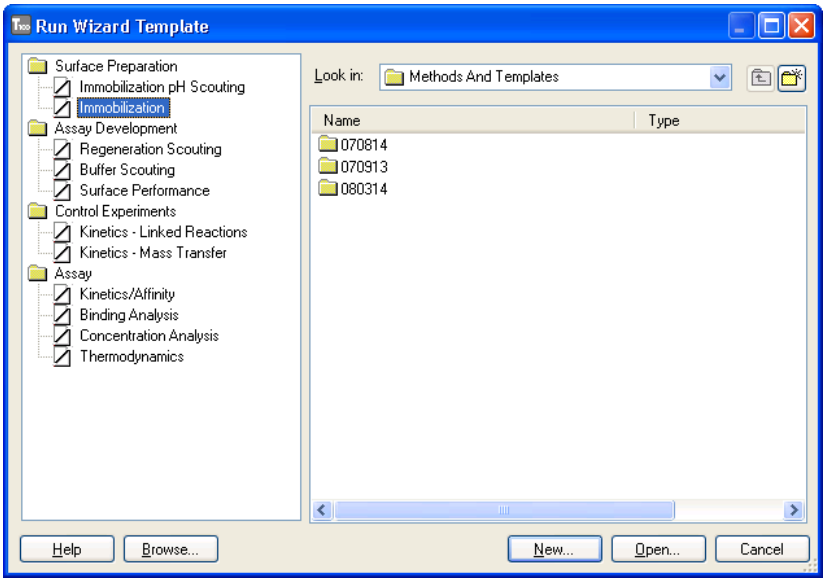
Final　NHS/EDC 添加前からエタノールアミン添加終了後の差

リガンドがアグリゲーションしている場合やセンサーチップ表面に吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより、非共有結合でセンサーチップ表面に残ったリガンドは洗い流されるため、Final のレスポンスは Bound より小さくなる。また、きわめて固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半に（一部はリガンドが導入されている）エタノールアミンが導入されるため、Final のレスポンスは Bound より大きくなることがある。いずれの場合も、レスポンスが小さい方を固定化量として採用する。

3-1-3. 固定化量を調節して固定化

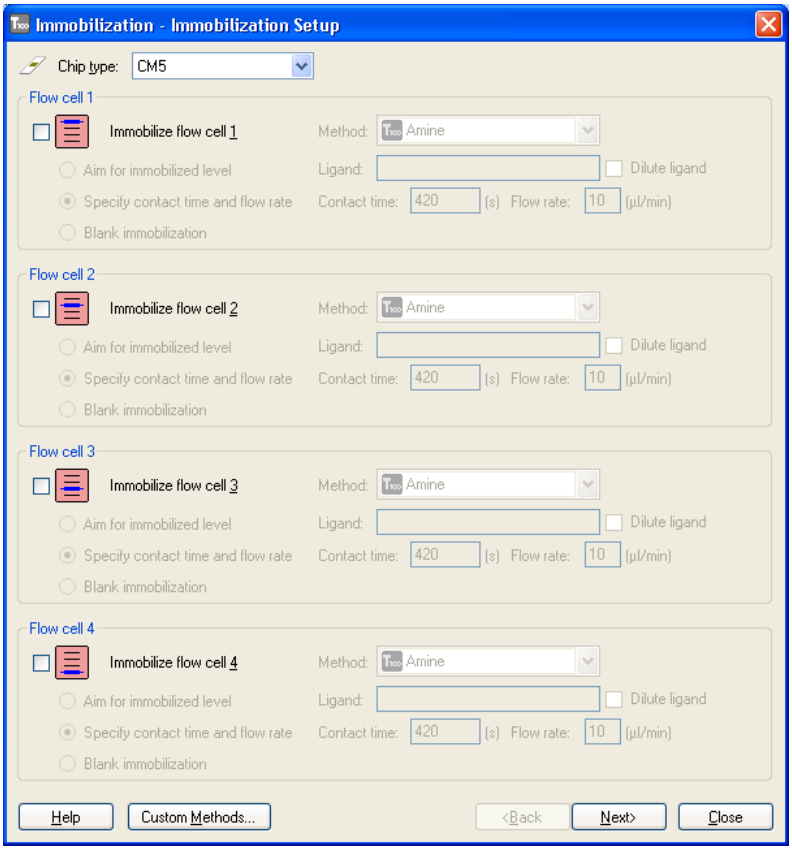
反応速度定数算出を目的とした実験の場合、厳密に固定化量を調節する必要がある。その場合、リガンドの添加方法として、**Aim for Immobilized level** を利用する。
なお、固定化量をできるだけ多くしたい場合には以下の方法は不向きである。この場合には、リガンド添加時間を長くする方法で固定化する（補足 3-2 参照。）

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。



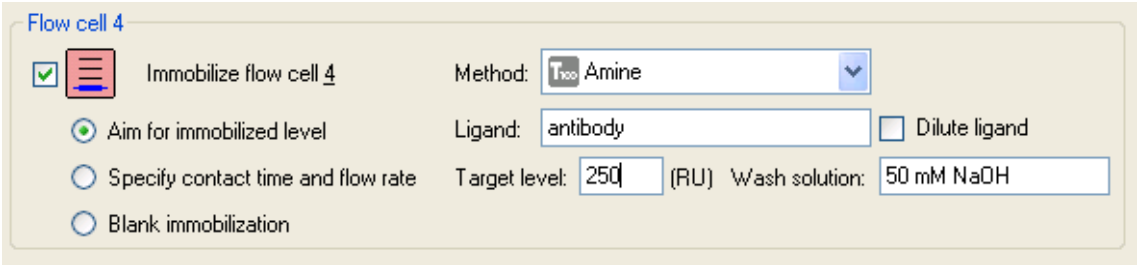
Surface Preparation → **Immobilization** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



Chip type のプルダウンメニューで、使用するセンサーチップ（**CM5**）を選択する。

↓



固定する **Flow cell** を選択する。**Aim for immobilized level** にチェックを入れる。

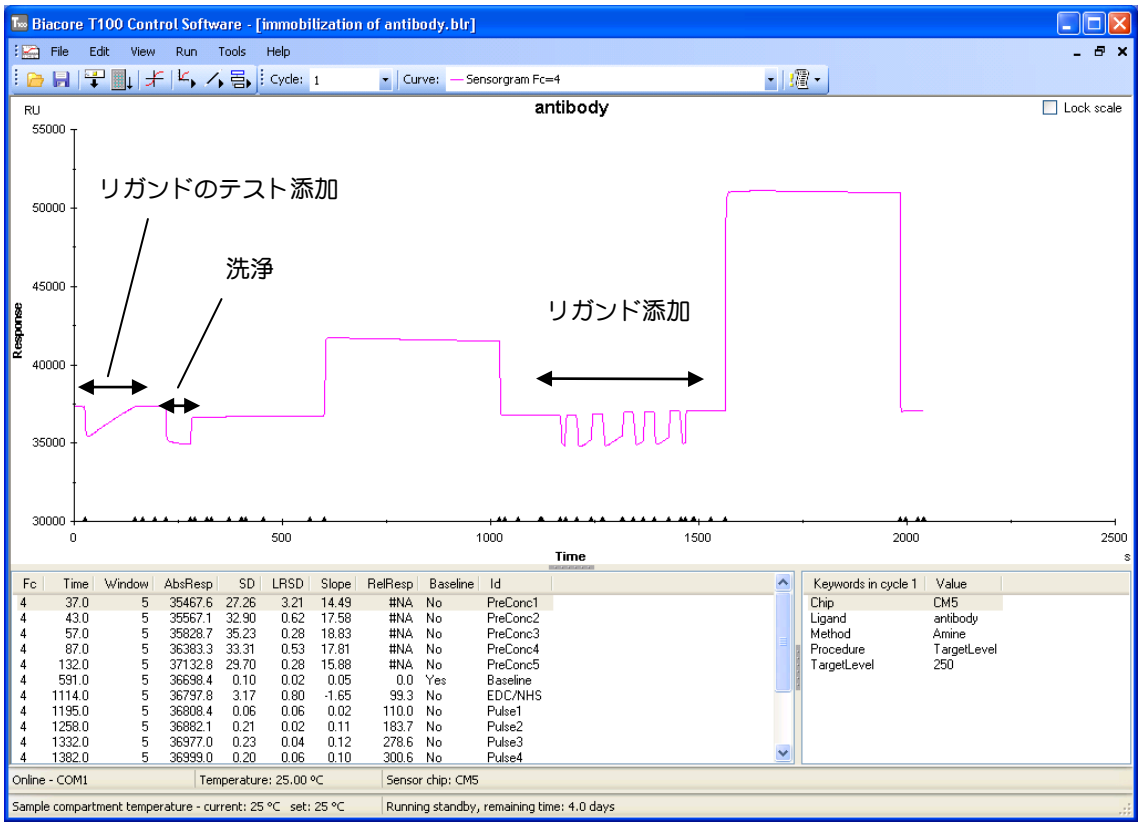
Method	固定化方法	**Amine** を選択
Ligand	リガンドの名称	
Target level	目標固定化量（RU）	
Wash solution	固定化前のリガンドテスト添加後のチップ表面洗浄液（50 mM NaOH）	

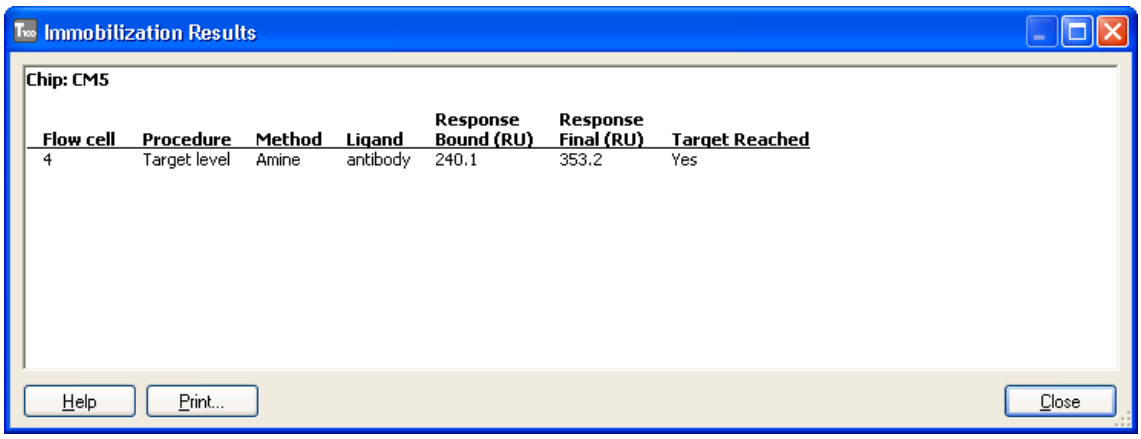
各項目に情報を入力後、**Next >**をクリックする。

↓

以下測定方法は、37～40 ページを参照。

↓

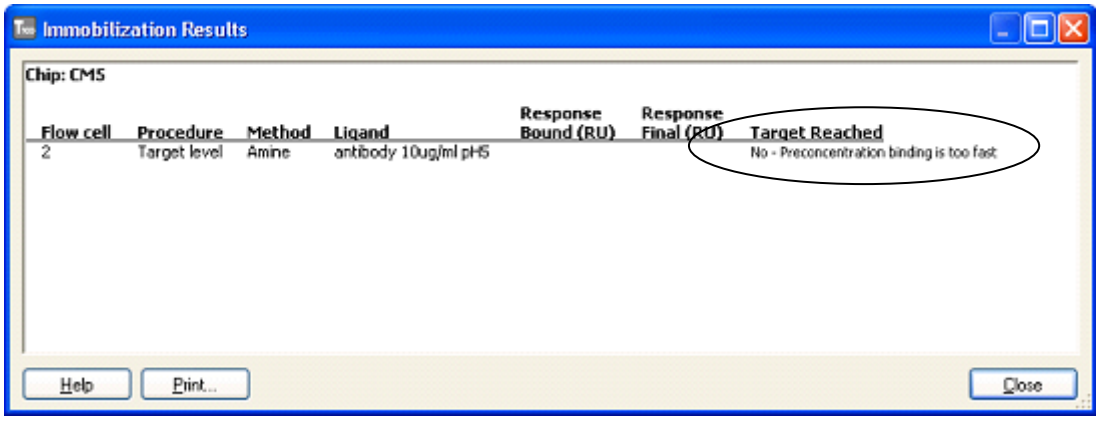

Biacore T100 Control Software - [immobilization of antibody.blr]
File Edit View Run Tools Help
Cycle: 1
Curve: Sensorgram Fc=4
antibody
Lock scale
RU
Response
リガンドのテスト添加
洗浄
リガンド添加
Time
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
4 37.0 5 35467.6 27.26 3.21 14.49 #NA No PreConc1
4 43.0 5 35567.1 32.90 0.62 17.58 #NA No PreConc2
4 57.0 5 35828.7 35.23 0.28 18.83 #NA No PreConc3
4 87.0 5 36383.3 33.31 0.53 17.81 #NA No PreConc4
4 132.0 5 37132.8 29.70 0.28 15.88 #NA No PreConc5
4 591.0 5 36698.4 0.10 0.02 0.05 0.0 Yes Baseline
4 1114.0 5 36797.8 3.17 0.80 -1.65 99.3 No EDC/NHS
4 1195.0 5 36808.4 0.06 0.06 0.02 110.0 No Pulse1
4 1258.0 5 36882.1 0.21 0.02 0.11 183.7 No Pulse2
4 1332.0 5 36977.0 0.23 0.04 0.12 278.6 No Pulse3
4 1382.0 5 36999.0 0.20 0.06 0.10 300.6 No Pulse4
Keywords in cycle 1 Value
Chip CM5
Ligand antibody
Method Amine
Procedure TargetLevel
TargetLevel 250
Online - COM1
Temperature: 25.00 °C
Sensor chip: CM5
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C
Running standby, remaining time: 4.0 days


Immobilization Results
Chip: CM5
Flow cell Procedure Method Ligand Response Bound (RU) Response Final (RU) Target Reached
4 Target level Amine antibody 240.1 353.2 Yes
Help
Print...
Close

Immobilization Results ダイアログに固定化量（RU）が表示される。目標固定化量に到達したかは、**Target Reached** に表示される。最終的な固定化量は、前章同様、小さい方の Response を採用する。

補足 3-5. 固定化ウィザードの中断

このウィザードでは NHS 活性化前に、リガンド溶液をテスト添加し、濃縮効果が得られるか、また、その結果から目的の固定化量が調節できる条件であるかを判断する。
リガンド条件に問題がある場合、この時点でプログラムが自動的に終了する。リガンドは固定化されていないので、リガンド溶液を調製しなおして、同じフローセルに再度固定化を試みる。



Preconcentration binding is too fast

濃縮効果が強すぎ、添加時間を短くしても目標のレベル以上固定化されると判断。希釈緩衝液の pH を上げるか、リガンド濃度を下げることにより、濃縮効果を下げて固定化し直す。

Preconcentration binding is too slow

濃縮効果が不十分または観察されず、添加時間を長くしても目標のレベルまで固定化できないと判断。希釈緩衝液の pH を下げるか、リガンド濃度を上げることにより、濃縮効果を上げて固定化し直す。

4. マニュアル測定による相互作用の条件検討

マニュアル操作により、アナライトの特異的結合の確認をおこなう。引き続き、再生条件の検討をおこなう。再生条件が決まったら、同一濃度のアナライトを添加し、再現性の確認をおこなう。
なお、シングルサイクル法で速度定数・解離定数の算出をおこなう場合には、再生条件の検討は必要ない。固定化後、目的に応じた相互作用測定を実施する。

アナライト

リガンドを固定化したセンサーチップに対して、リガンドとの結合を測定する目的で添加する分子。血清や培養上清等のクルード（crude）なサンプルを使用できるが、不溶性の粒子等は遠心などで除去する。反応速度定数や解離定数算出を目的とした実験の場合は、モル濃度が既知のアナライトが必要となる。

アナライトの調製

ランニング緩衝液で希釈する。希釈できない場合は、ランニング緩衝液でゲルろ過等を使用し緩衝液交換するか、ランニング緩衝液自体をアナライト溶解液条件にあわせることが必要となる場合がある。緩衝液が異なる場合には、溶液効果（Bulk Effect：ランニング緩衝液と添加溶液（アナライトなど）の密度の差により発生するレスポンスの差）が発生する。反応速度定数や解離定数の算出を目的とした実験においては、結合領域（アナライト溶解液）と解離領域（ランニング緩衝液）が異なる緩衝液組成条件下の測定になり、解析結果に影響を与える可能性がある。アナライト濃度は結合の強さや分子量にもよるが、数十 ng/ml～数百 µg/ml でおこなう。反応速度定数を算出する場合には、予想される K_D（解離定数）値濃度の 1/10～10 倍の濃度で解析すると良好な結果が得られる。予備検討時は、結合が弱いことや再生条件（リガンドに結合したアナライトを溶出し、リガンド固定化表面を固定化直後の状態に再生する操作）を検討する必要性を考慮し、ある程度、高濃度（タンパク質アナライトの場合、数～数十 µg/ml）を用いるのが望ましい。

リファレンスセル

溶液効果および非特異的吸着を差し引くために、必ずリファレンスセルへもアナライトを添加する。リファレンスセルは、未処理のセル、活性化・ブロッキングセル、ネガティブコントロール固定化セルなどを利用する。

再生溶液

リガンドに結合したアナライトを強制的に解離させる操作を再生という。解離が速い相互作用では、ランニング緩衝液が流れることで、短時間でアナライトが完全に解離するため再生の必要がない。解離速度が遅い相互作用の場合には、適当な塩、酸、アルカリ溶液をアナライト結合表面に 30 秒～1 分間添加し再生をおこなう。至適な再生条件（どの溶液で何分間、何回添加するか）は、分子間ごとに異なるため、その都度検討が必要となる。

理想的な再生条件

リガンドの活性が失われない
アナライトを完全に解離する
リガンドがセンサーチップ表面から遊離しない

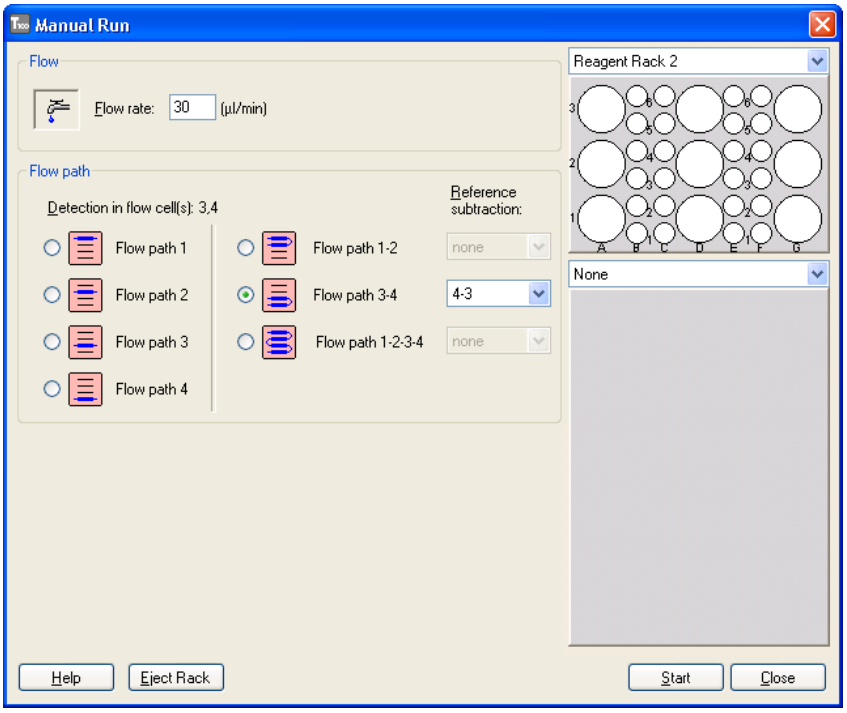
補足 4-1. 再生溶液の種類

再生溶液は通常以下のようなものが使用される。検討の際にはマイルドな条件から検討をおこなう（塩溶液→酸溶液→アルカリ溶液）。添加時間は、1 分以内で検討する。

試薬	濃度あるいは pH
塩	
NaCl	< 2 M
酸性条件	
10 mM Gly-HCl	> pH 1.5
HCl	< 100 mM
Phosphoric acid	< 100 mM
Formic acid	< 20 %
アルカリ条件	
10 mM Gly-NaOH	< pH 12
NaOH	< 100 mM
Ethanolamine	< 100 mM
Ethanolamine-HCl	< 1 M
キレート剤　多価カチオン依存性反応の場合	
EDTA	< 0.35 M
界面活性剤	
Surfactant P-20　(Tween 20)	< 5 %
Triton X-100	< 5 %
SDS	< 0.5 %
Octylglucoside	< 40 mM
有機溶媒	
Acetonitrile	< 20%
DMSO	< 8%
Ethylene glycol in HBS Buffer	< 50%
Ethanol	< 20%
Formamide	< 40%
変性剤	
Guanidine-HCl	< 5M
Urea	< 8M

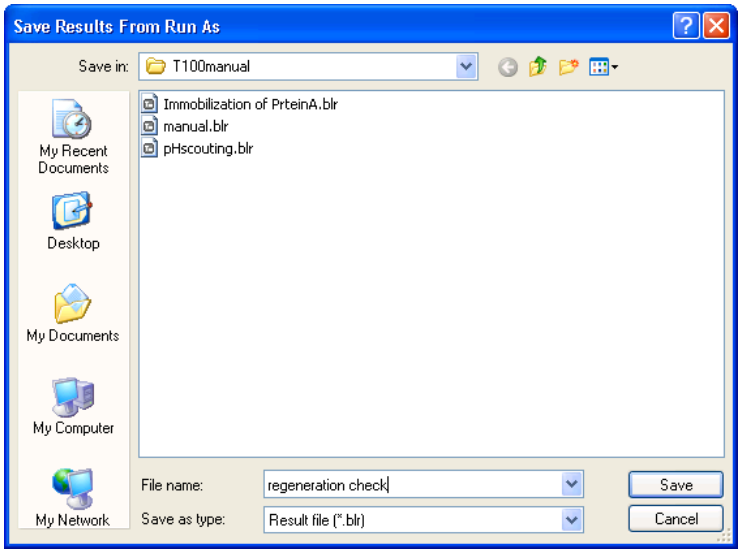
Toolbar の **Start Manual run** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Manual run** をクリックする。

↓



流速（**Flow rate**）（30 µl/min）を入力する。**Flow path** でアナライトを添加するリファレンスセルと固定化セルの選択をおこなう。必ず、**Reference subtraction** でリファレンスセルの差し引き設定をおこなう。（選択肢として 2-1, 4-3 または、2-1, 3-1, 4-1 がある。）
Rack の選択をおこない **Start** クリックする。

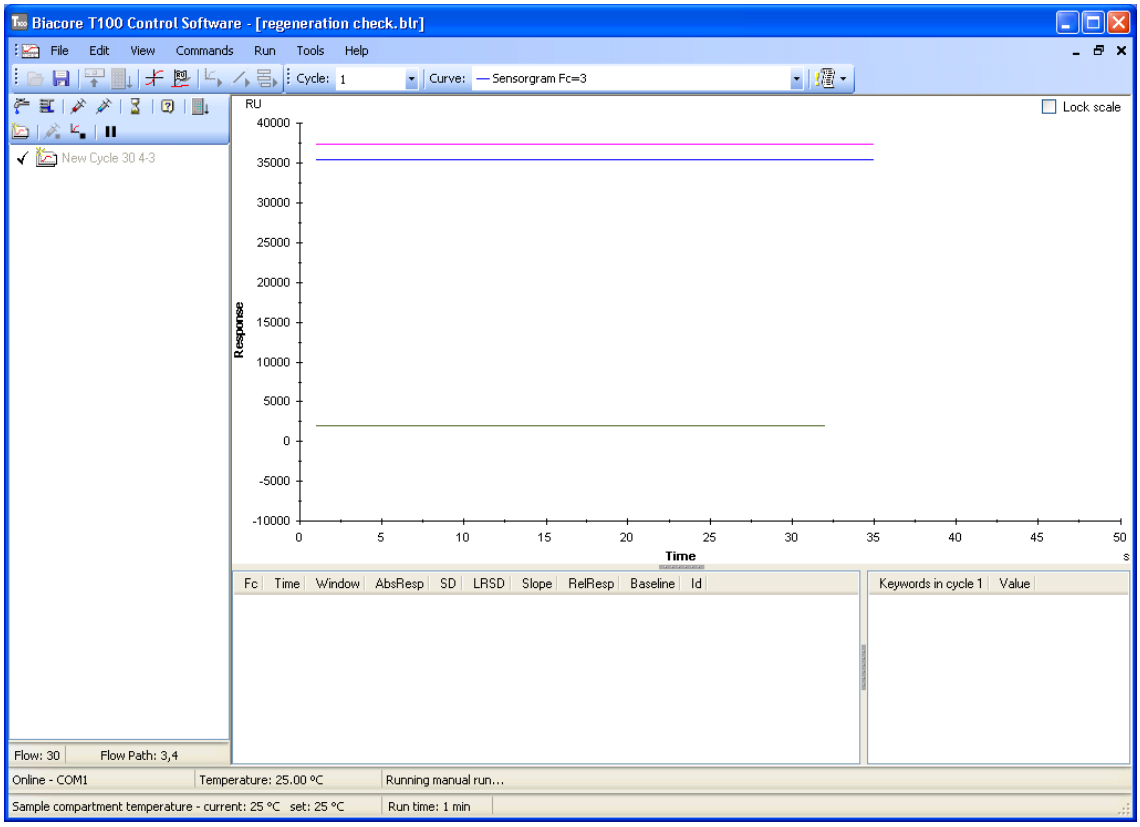
↓



測定結果の保存先へ **File name** を入力して **Save** をクリックする。

↓

センサーグラムが表示され測定が開始する。


Biacore T100 Control Software - [regeneration check.blr]
File Edit View Commands Run Tools Help
Cycle: 1
Curve: Sensorgram Fc=3
New Cycle 30 4-3
RU
Lock scale
Response
Time
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
Keywords in cycle 1 Value
Flow: 30 Flow Path: 3,4
Online - COM1 Temperature: 25.00 °C Running manual run...
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C Run time: 1 min

補足 4-2. センサーグラムの表示変更

View → Show Only Current Curve

選択したセンサーグラムを 1 本表示。

右上のカーブリストから、表示するセンサーグラムを選択する。

View → Show All Curves

すべてのセンサーグラムを表示。

View → Show Curves of Same Type

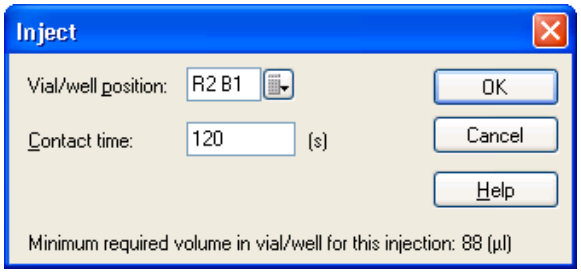
カーブの種類別表示。

右上のカーブリストから、各フローセルのセンサーグラムもしくは差し引きセンサーグラムのいずれかを選択して表示することができる。

↓

Inject command アイコン（ ；赤色）または **Menu bar** の **Commands → Inject...**を選択する。

↓



アナライトの位置（**Vial/well position**）および、添加時間（**contact time**）60～120 秒を入力すると、**Inject** ダイアログの右下に必要なサンプル量が表示される。

↓

一旦、**Cancel** をクリックし、**Eject rack tray** アイコン（ ）または Menu bar の **Commands** → **Eject Rack** を選択する。

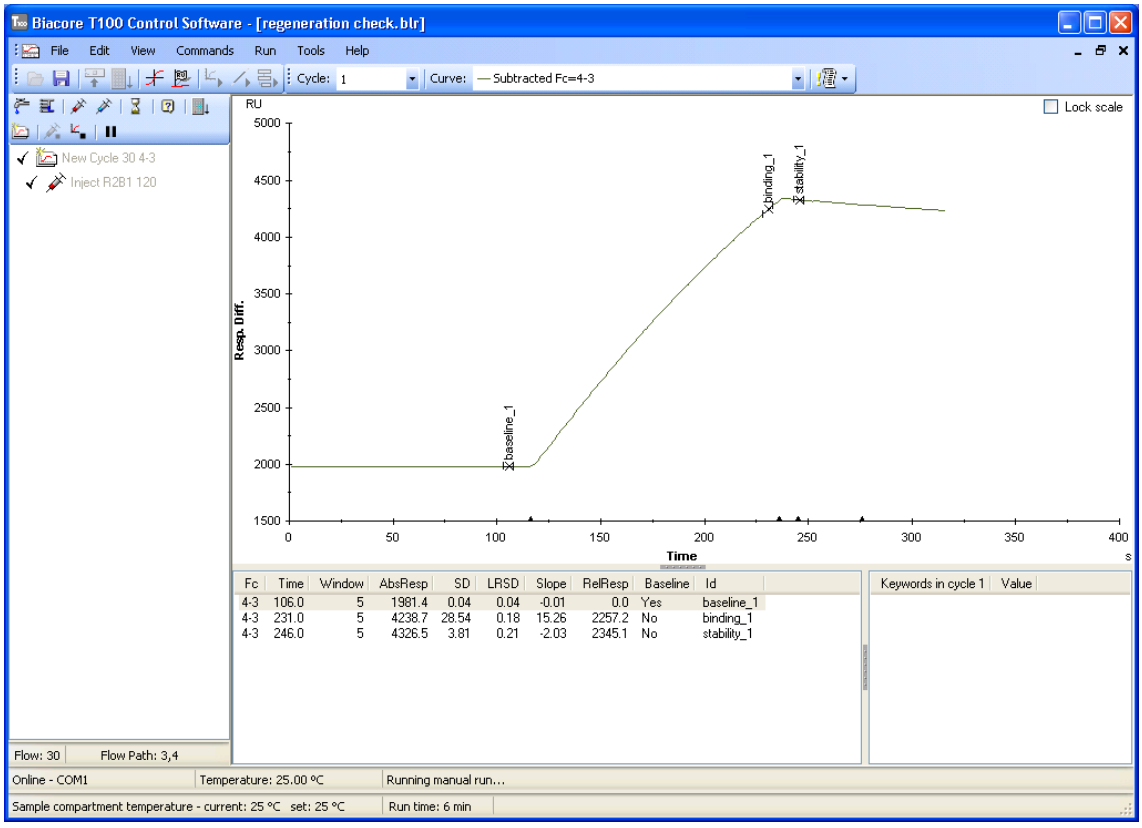
ラックトレイを取り出して、アナライトを分注したバイアルをセットする。ラックトレイを再び本体に戻して **OK** をクリックする。

Inject command アイコンを選択する。

↓

アナライトの位置および添加時間（s）を入力する。**OK** をクリックする。

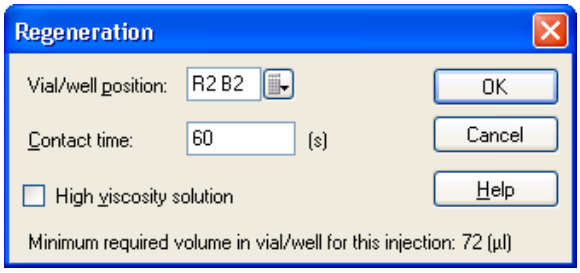
↓


Biacore T100 Control Software - [regeneration check.blr]
File Edit View Commands Run Tools Help
Cycle: 1
Curve: Subtracted Fc=4-3
New Cycle 30 4-3
Inject R2B1 120
RU
Lock scale
Resp. Diff.
baseline_1
binding_1
stability_1
Time
s
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
4-3 106.0 5 1981.4 0.04 0.04 -0.01 0.0 Yes baseline_1
4-3 231.0 5 4238.7 28.54 0.18 15.26 2257.2 No binding_1
4-3 246.0 5 4326.5 3.81 0.21 -2.03 2345.1 No stability_1
Keywords in cycle 1 Value
Flow: 30 Flow Path: 3,4
Online - COM1
Temperature: 25.00 °C
Running manual run...
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C
Run time: 6 min

アナライトの結合を確認する。再生の必要がある場合には引き続き検討をおこなう。

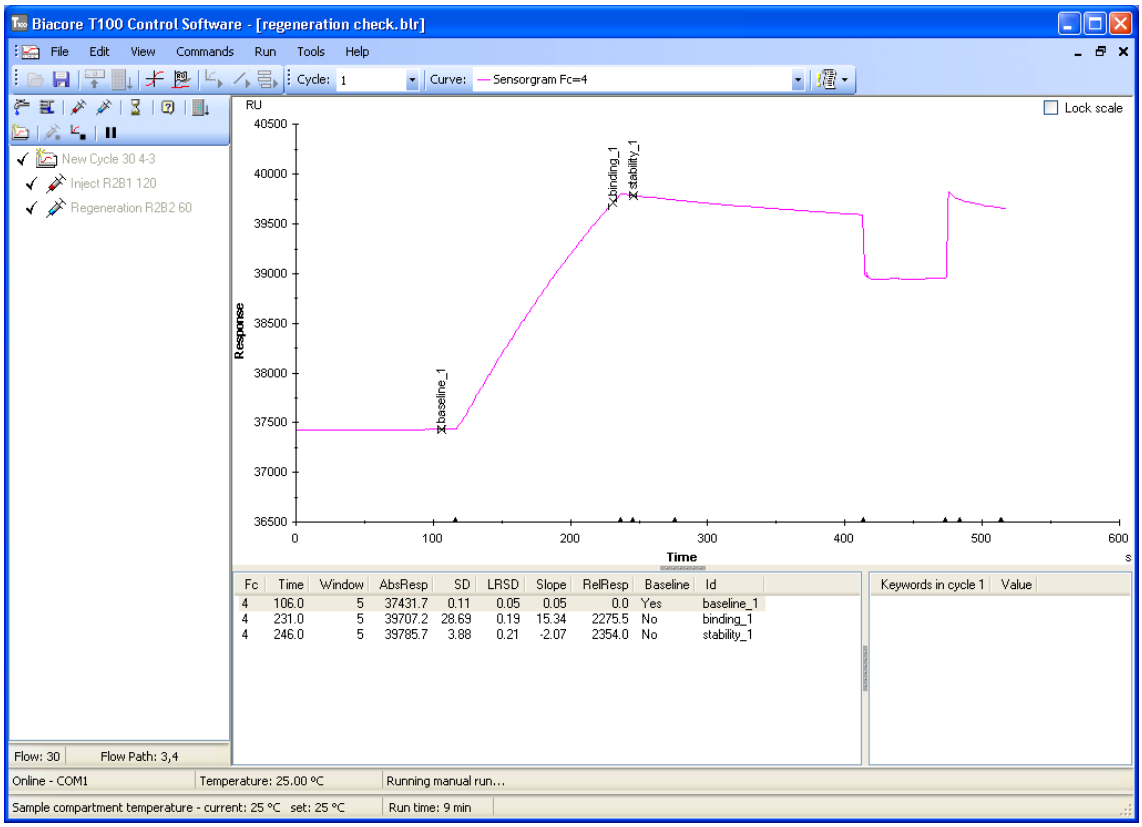
Regeneration command アイコン（ ；青色）または **Menu bar** の **Commands** → **Regeneration...**を選択する。

↓



再生溶液の位置および添加時間（30～60s）を入力して、**OK** をクリックする。
（再生溶液をセットしていない場合には、必要容量確認後、一旦、**Cancel** をクリックしてバイアルをセットする。）

↓



↓

レポートポイントまたはリファレンスラインウィンドウを利用して、再生の確認をおこなう。
再生が不十分な場合には、引き続き検討をおこなう。

↓

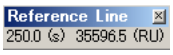
再生条件検討後、固定化リガンドの活性および再現性を確認する。

New Cycle アイコン（ ；アイコンが並んでいる下段左から 1 番目）をクリックし、測定サイクルを切り替える。同濃度のアナライトを添加し、前回のアナライト結合レスポンスと比較する。引き続き再生をおこなう。

↓

すべての検討が終了したら、**End Manual run** アイコン（ ）または Menu bar の **Commands** → **End Run** をクリックする。装置は自動的に **Standby flow** 状態になる。
測定データは初めに入力したファイル名で自動に保存される。

補足 4-3. リファレンスウィンドウを利用した再生の確認方法

Tool bar の **Reference Line** アイコン（ ）あるいは **View** → **Reference Line** をクリックし、センサーグラム上にリファレンスラインを表示させる。同時にセンサーグラム左上にリファレンスラインウィンドウ（ 

）が表示される。

↓

マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線上に移動後、マウスの左ボタンをドラッグし、ベースラインを取りたい時間に移動する。もしくはベースラインを取りたい場所のセンサーグラム上の位置でカーソルをクリックし、リファレンスラインを移動する。

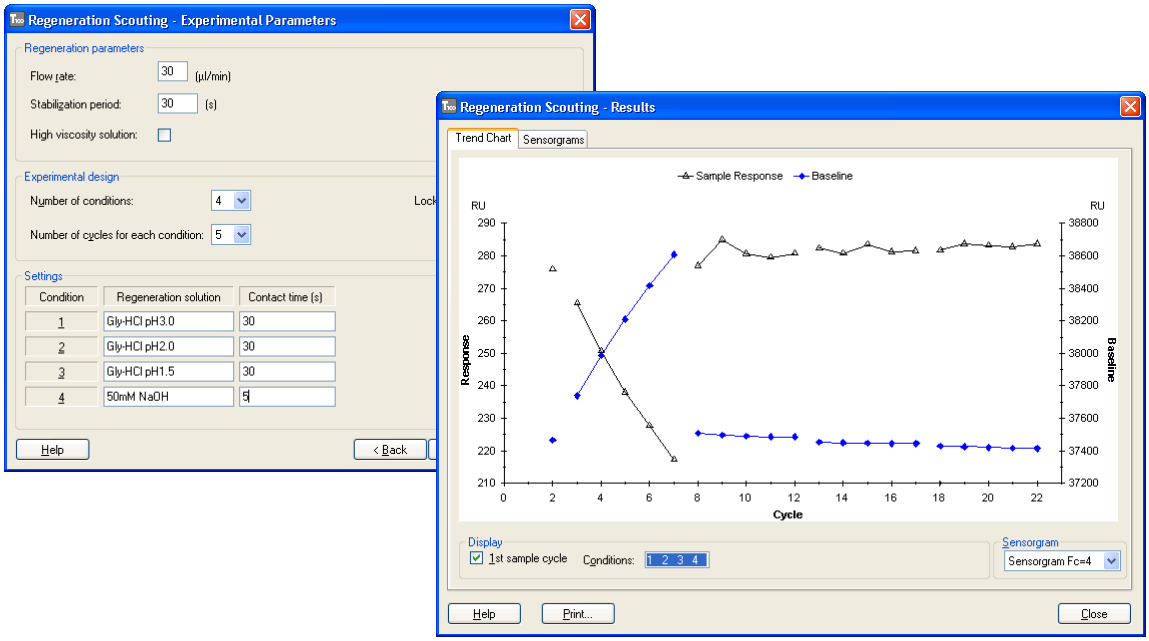
↓

View → **Base Line** をクリックする（もしくは F9 ボタンを押す）と、リファレンスラインウィンドウのレスポンスが相対値 0 となる。リファレンスラインの縦軸にもう一度カーソルをあわせ、左ボタンでドラッグし移動させると、リファレンスウィンドウにベースラインとして設定した位置からのレスポンスが表示される。

補足 4-4. ウィザードを用いた再生条件の検討

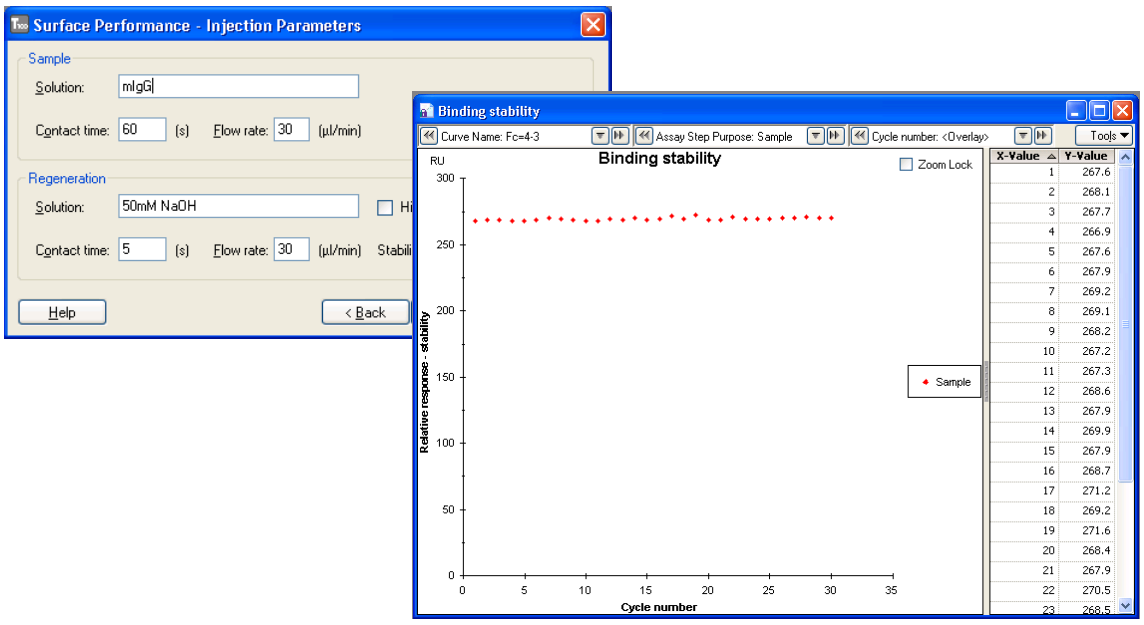
Application Wizard/ Assay Development/ **Regeneration Scouting**

複数の再生溶液を用いて、各再生溶液で設定した添加条件で、最大 5 回まで、アナライト結合量の変化とベースラインの安定性を評価できる。



Application Wizard/ Assay Development/ **Surface Performance**

決定した再生条件でセンサーチップの安定性を評価する。400 回までの繰り返し測定が可能。



5. 相互作用測定

実験目的に応じたウィザードまたはメソッドのテンプレートに、サンプル名や添加情報および再生条件等、必要事項を入力するだけで、プログラムを組み立てることができる。
この章では、上記テンプレートを利用した基本的なプログラム作成について記載する。メソッド作成方法の詳細は 6 章を参照。

ウィザードテンプレートを利用

反応速度定数および解離定数の算出　マルチサイクル法

Kinetics/Affinity　54 ページ

濃度測定　Concentration Analysis　123 ページ

結合の有無の確認、スクリーニング　Binding Analysis　174 ページ

熱力学的パラメータの算出　Thermodynamics　193 ページ

低分子化合物アナライトの反応速度定数および解離定数の算出

Kinetics/Affinity　211 ページ

メソッドテンプレートを利用

反応速度定数および解離定数の算出　シングルサイクル法

Single-cycle kinetics　93 ページ

検量線不溶の濃度測定　Calibration-Free Concentration　143 ページ

低分子化合物アナライトのスクリーニング　LMW screen　247 ページ

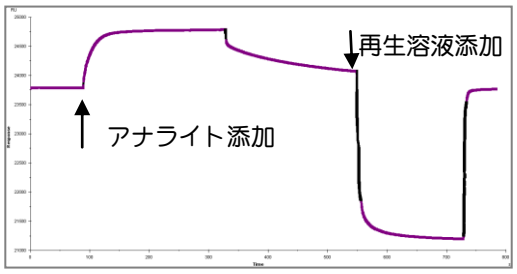
結合アナライトの回収　Inject and recover　233 ページ

5-1. 反応速度定数・解離定数の算出　マルチサイクル法

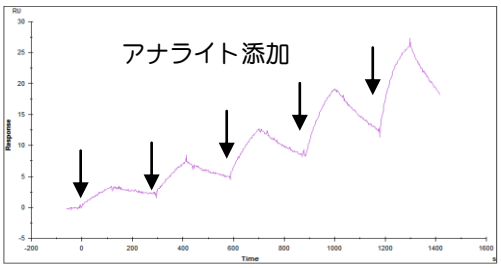
マルチサイクル法とシングルサイクル法

1 濃度のアナライト添加とリガンドの再生操作を 1 サイクルとして、濃度が異なるアナライトを繰り返し測定し、得られたセンサーグラムから反応速度定数・解離定数を算出する方法を**マルチサイクル法**と呼ぶ。一方、異なるアナライト濃度系列を再生操作なしに低濃度側から連続添加し、得られたセンサーグラムを利用して反応速度定数・解離定数を算出する方法を**シングルサイクル法**と呼ぶ。

マルチサイクル法



シングルサイクル法



アフィニティーとカイネティクス

分子同士が相互作用する時には、両者にはアフィニティー（親和性）があると表現する。解離定数は、アフィニティーの強さを表す尺度として一般的に使用され、K_D（単位 M）として記述される。その逆数 1/ K_D（= K_A、単位 1/M）が用いられることもある。解離定数は、A+B⇔AB 反応の平衡状態において、K_D = ［A］［B］/［AB］と定義される。形成される複合体の割合が多いほど、つまり、この数値が小さいほどアフィニティーは強い。Biacore を用いたカイネティクス解析では、アフィニティーは、その分子間の反応速度定数から算出する（ $K_D = k_d / k_a$ ）。速い結合および遅い解離の相互作用ほどアフィニティーは強い。これら反応速度（カイネティクス）に関するパラメータは、結合速度定数（k_a、単位 $M^{-1}s^{-1}$）、解離速度定数（k_d、単位 s^{-1}）として表現される。

$$A + B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AB$$

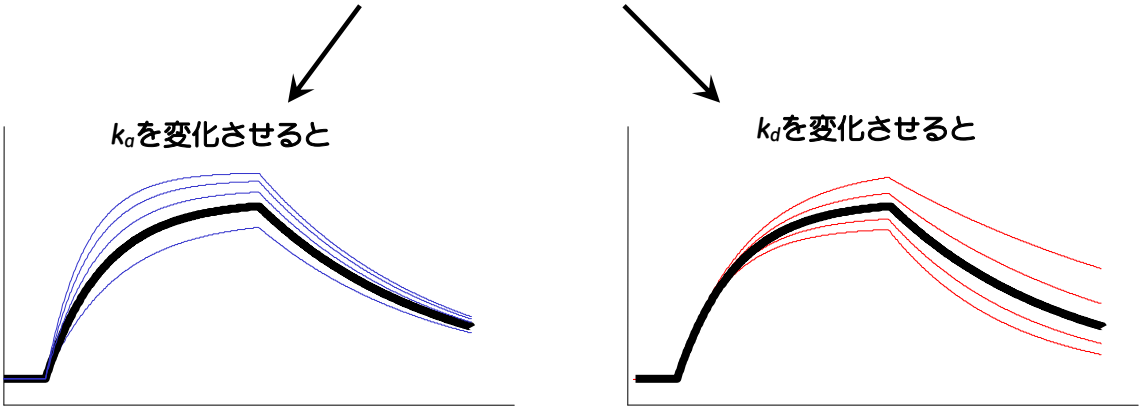
$$K_D = k_d / k_a$$

$$K_A = k_a / k_d$$

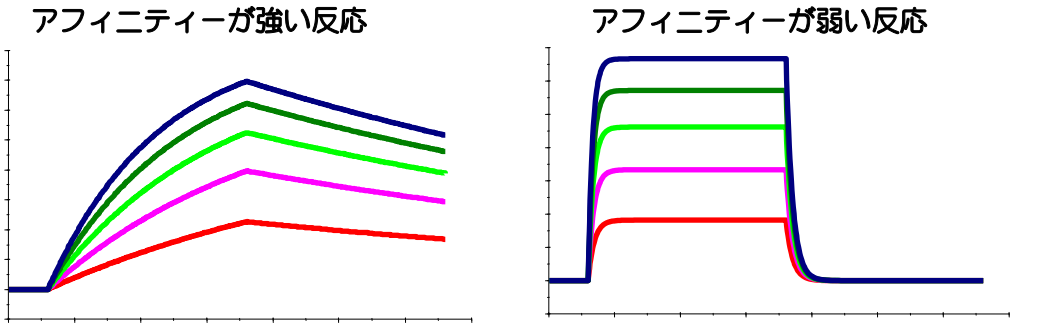
解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a、k_d）の算出方法

カイネティクス解析では、得られたセンサーグラムに直接反応速度式をカーブフィッティングさせ、非線形最小二乗法により定数を導き出す。

$$R = f\ (k_a, k_d, Rmax, C, \ldots)$$



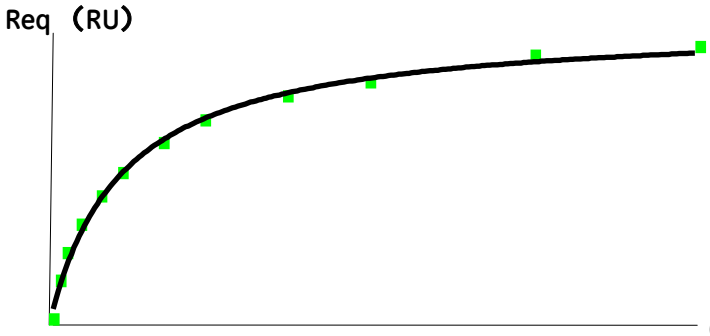
アフィニティーの弱い（≒解離が速い）相互作用の場合、反応はきわめて早く平衡状態（Req）へと移行するが、複合体の安定性は悪いため、センサーグラムは『箱型』となる。結合領域および解離領域はきわめて短く、カーブフィッティングによる反応速度定数の算出は困難である。



カーブフィッティングによる解析　　Req vs C のプロットからの平衡値解析

このような場合、アナライト濃度（C）に対する平衡値（Req）のプロットから、親和定数（K_A）あるいは解離定数（K_D）を算出する。平衡状態では、以下の関係式が成り立つ。

$$Req = C \times R_{max} / (C + K_D)$$



至適なアナライト濃度

良好な結果を得るためには、予想される解離定数（K_D）値の 1/10～10 倍の濃度で測定する。結合速度または解離速度が遅く、結合領域のセンサーグラムの傾きが直線的な場合には、センサーグラムのカーブが得られる高濃度領域もとると良好な解析結果が得られる。また、5 段階以上の濃度系列と濃度 0（アナライトを含まない緩衝液のみ）について測定し、1 濃度については再現性の確認目的で 2 回（n=2）測定する。

アフィニティーが弱く、箱型のセンサーグラムになり、カイネティクス解析が困難な場合は、10 段階以上の濃度系列と濃度 0 について測定する。濃度範囲は高濃度側まで幅広くとることを推奨する。

至適な流速

30 µl/min 以上の高流速に設定する。

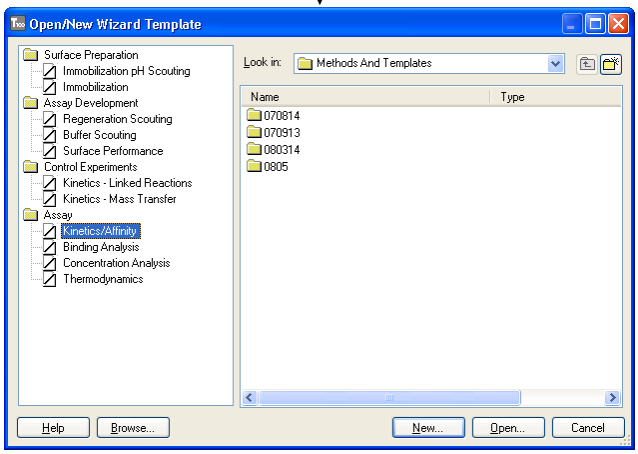
アナライト添加時間と解離時間

通常は、添加 2 分程度、解離 2 分程度であれば良い。ただし、結合速度または解離速度が遅く結合領域のセンサーグラムが直線的な場合には、センサーグラムのカーブを得るために、添加時間を 5～10 分程度にすると良い。また、解離速度が遅く、解離領域の傾きがほとんど確認できない場合には、解離時間を 10～30 分程度にすると良い。

5-1-1. プログラムの実行

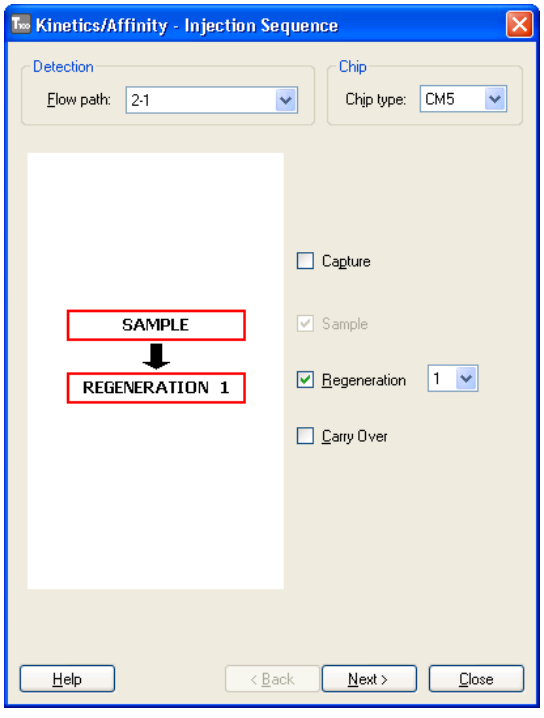
Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。

↓



Assay → **Kinetics/Affinity** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



1 サイクル分の測定シークエンスを設定する。

Detection

Flow path　相互作用測定をおこなうフローセルを設定する。2-1 または 4-3 から選択。

Chip

Chip type　利用するセンサーチップの種類を選択する。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドをトラップする場合にチェックを入れる。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされる。

Sample

アナライトの添加

Regeneration

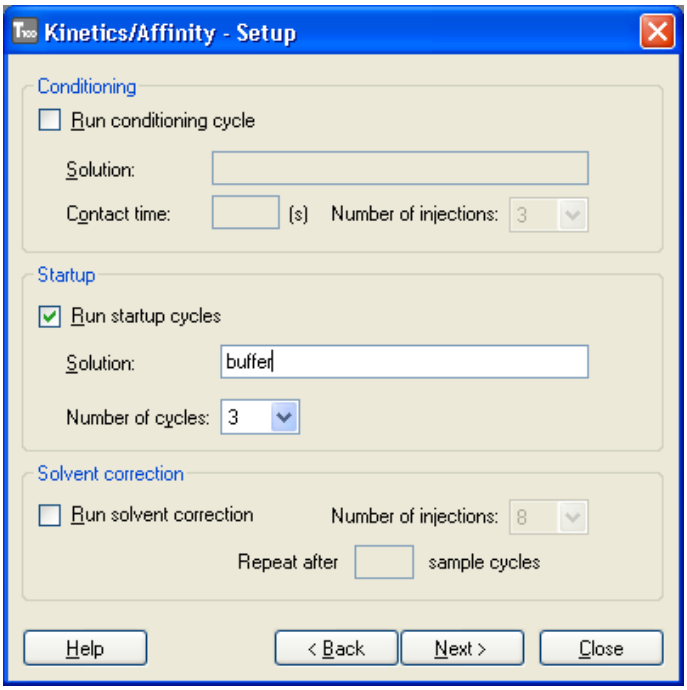
再生が必要な場合にチェックを入れる。添加回数 1 回もしくは 2 回の選択をする。

Carry Over

アナライトのキャリーオーバーの確認をおこなう場合にチェックを入れる。

Next >をクリックする。

↓



アナライト測定前のベースライン安定化のためのコンディショニングと、ダミーランサイクルの設定をおこなう。

Conditioning

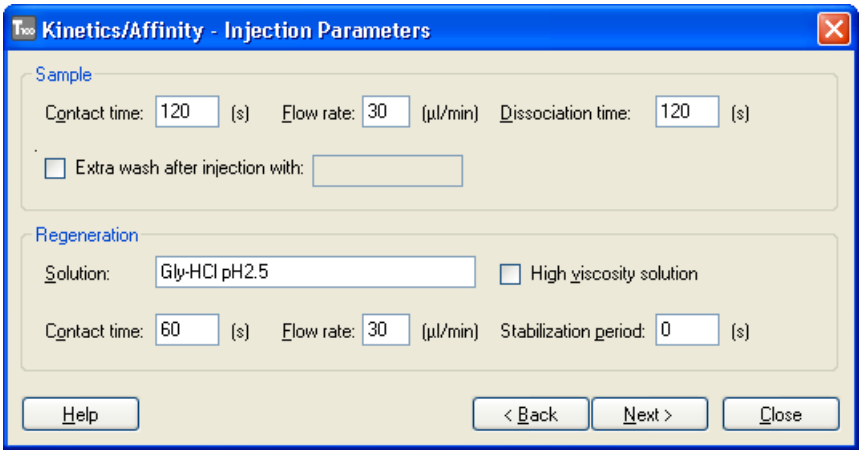
Solution　再生溶液または緩衝液の名称

contact time　添加時間（s）

	Number of injections	添加回数
Startup		
	Solution	指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施する。通常は、ランニング緩衝液を用いる。
	Number of cycles	サイクル数。3 回以上を推奨する。

Next >をクリックする。

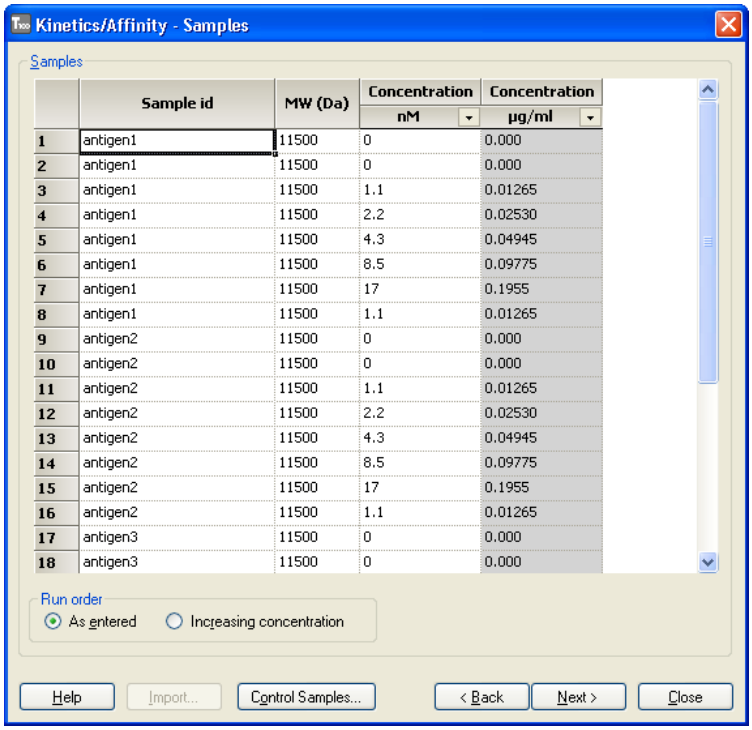
↓



Sample			
	contact time	アナライトの添加時間	120 s
	Flow rate	流速	30 µl/min
	Dissociation time	解離時間	120 s
Regeneration			
	Solution	再生溶液の名称	
	High viscosity solution	粘性の高い溶液（40% エチレングリコール以上）の場合はチェックを入れる。	
	contact time	再生溶液の添加時間	30 s
	Flow rate	流速	30 µl/min
	Stabilization period	再生溶液添加後のベースライン安定化時間（必要に応じて設定する。）	0 s

入力後、**Next >**をクリックする。

↓

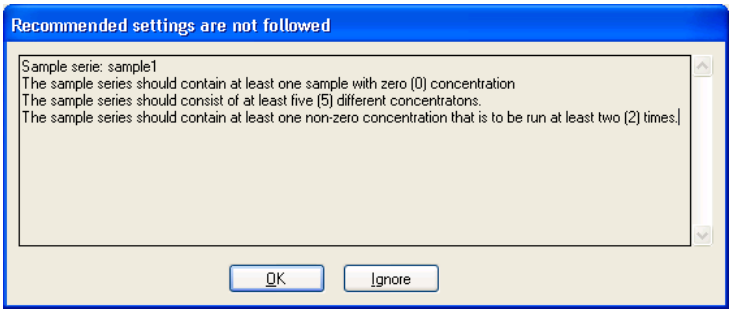


Sample id	アナライトの名称
MW　(Da)	アナライトの分子量
Concentration	アナライトの濃度（単位も選択） 分子量と濃度を入力すると、自動的に“モル濃度 nM ”と“重量濃度 µg/ml”を換算する。

入力後、**Next >**をクリックする。

補足 5-1. アナライト濃度

測定サンプル濃度は、アナライト 5 段階以上の濃度シリーズ と“0（ゼロ）濃度の測定を推奨している。また、測定中のリガンドの安定性確認のために“0（ゼロ）”以外で最低 1 濃度を 2 回測定することも推奨している。このルールに従わない場合、**Next >**をクリック時に警告が表示される。

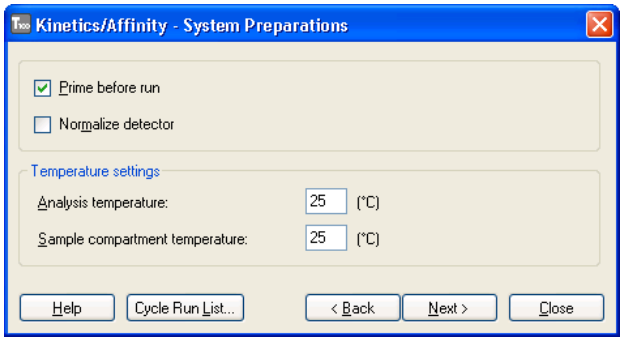


警告を無視して測定をおこなう場合は、**Ignore** をクリックし次のステップに進む。

補足 5-2. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

↓

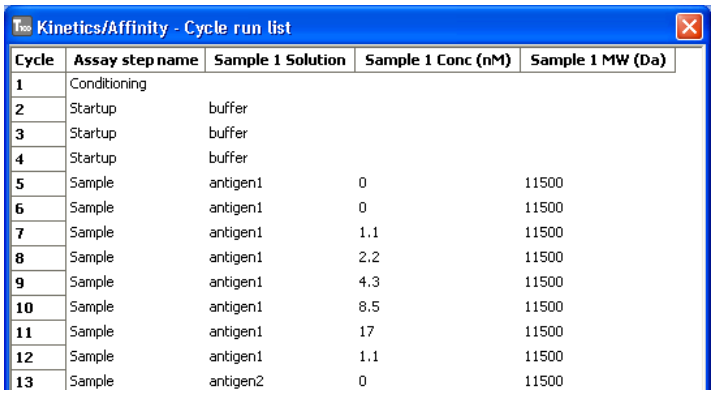


測定を始める前に、**Prime** および **Normalize** をおこなう場合にはチェックを入れる。

Temperature settings

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

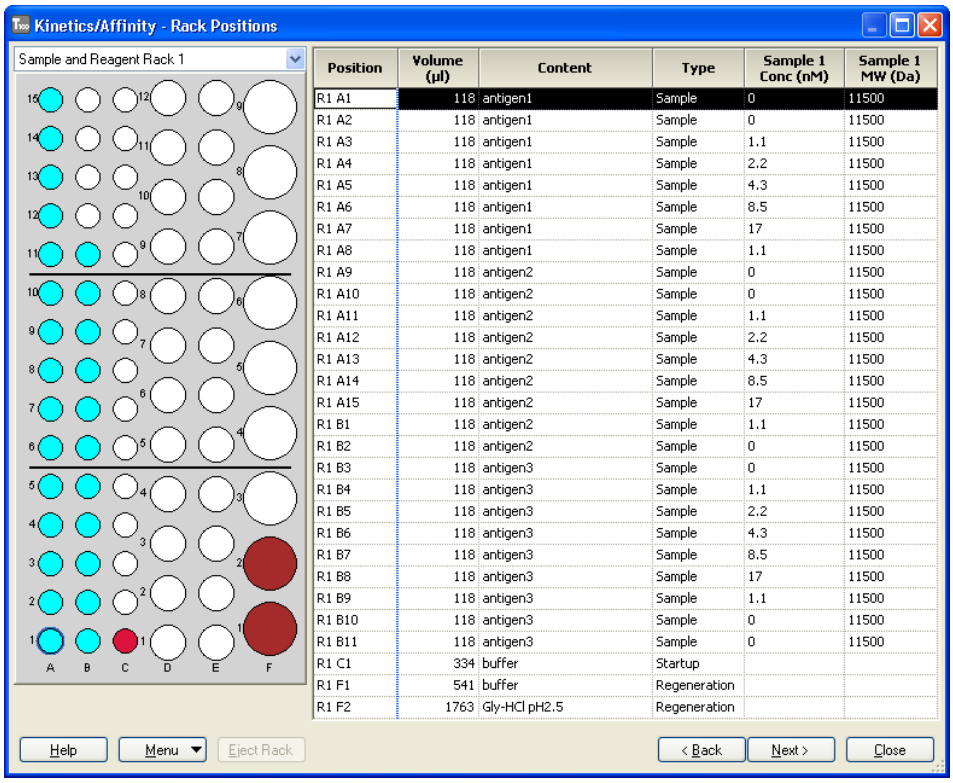
Cycle Run List...をクリックすると、測定サイクルの確認がおこなる。



Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 Conc (nM)	Sample 1 MW (Da)
1	Conditioning			
2	Startup	buffer		
3	Startup	buffer		
4	Startup	buffer		
5	Sample	antigen1	0	11500
6	Sample	antigen1	0	11500
7	Sample	antigen1	1.1	11500
8	Sample	antigen1	2.2	11500
9	Sample	antigen1	4.3	11500
10	Sample	antigen1	8.5	11500
11	Sample	antigen1	17	11500
12	Sample	antigen1	1.1	11500
13	Sample	antigen2	0	11500

Next >をクリックする。

↓



Position	Volume (µl)	Content	Type	Sample 1 Conc (nM)	Sample 1 MW (Da)
R1 A1	118	antigen1	Sample	0	11500
R1 A2	118	antigen1	Sample	0	11500
R1 A3	118	antigen1	Sample	1.1	11500
R1 A4	118	antigen1	Sample	2.2	11500
R1 A5	118	antigen1	Sample	4.3	11500
R1 A6	118	antigen1	Sample	8.5	11500
R1 A7	118	antigen1	Sample	17	11500
R1 A8	118	antigen1	Sample	1.1	11500
R1 A9	118	antigen2	Sample	0	11500
R1 A10	118	antigen2	Sample	0	11500
R1 A11	118	antigen2	Sample	1.1	11500
R1 A12	118	antigen2	Sample	2.2	11500
R1 A13	118	antigen2	Sample	4.3	11500
R1 A14	118	antigen2	Sample	8.5	11500
R1 A15	118	antigen2	Sample	17	11500
R1 B1	118	antigen2	Sample	1.1	11500
R1 B2	118	antigen2	Sample	0	11500
R1 B3	118	antigen3	Sample	0	11500
R1 B4	118	antigen3	Sample	1.1	11500
R1 B5	118	antigen3	Sample	2.2	11500
R1 B6	118	antigen3	Sample	4.3	11500
R1 B7	118	antigen3	Sample	8.5	11500
R1 B8	118	antigen3	Sample	17	11500
R1 B9	118	antigen3	Sample	1.1	11500
R1 B10	118	antigen3	Sample	0	11500
R1 B11	118	antigen3	Sample	0	11500
R1 C1	334	buffer	Startup		
R1 F1	541	buffer	Regeneration		
R1 F2	1763	Gly-HCl pH2.5	Regeneration		

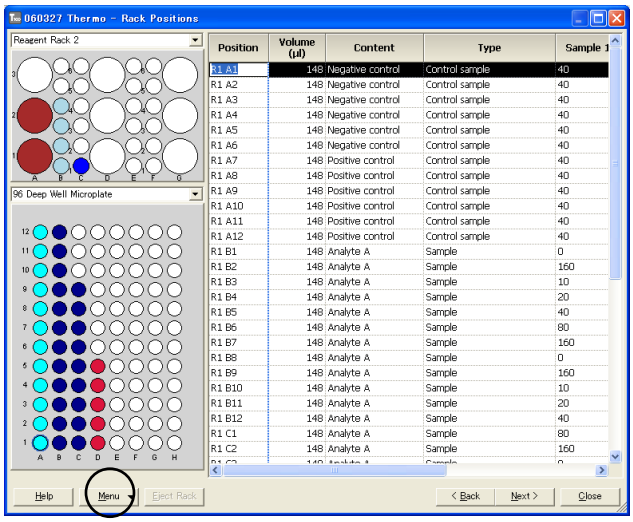
右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-3. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...** を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

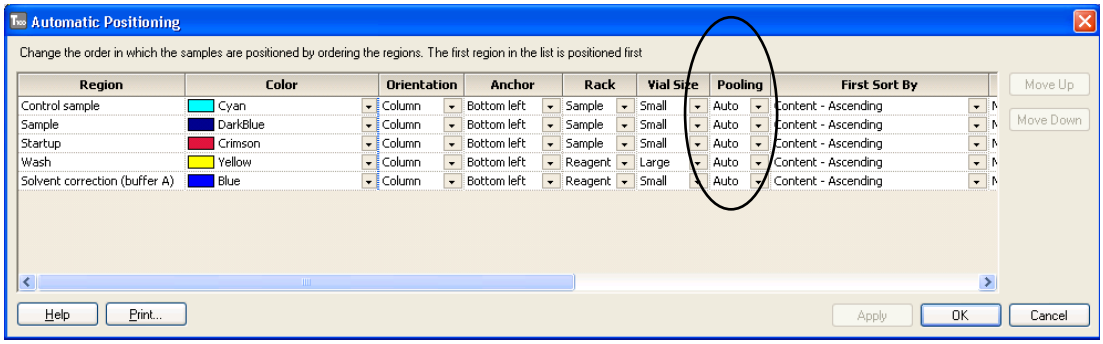
補足 5-4. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu から Automatic Positioning...を選ぶ。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定をおこなうことができる。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっている。

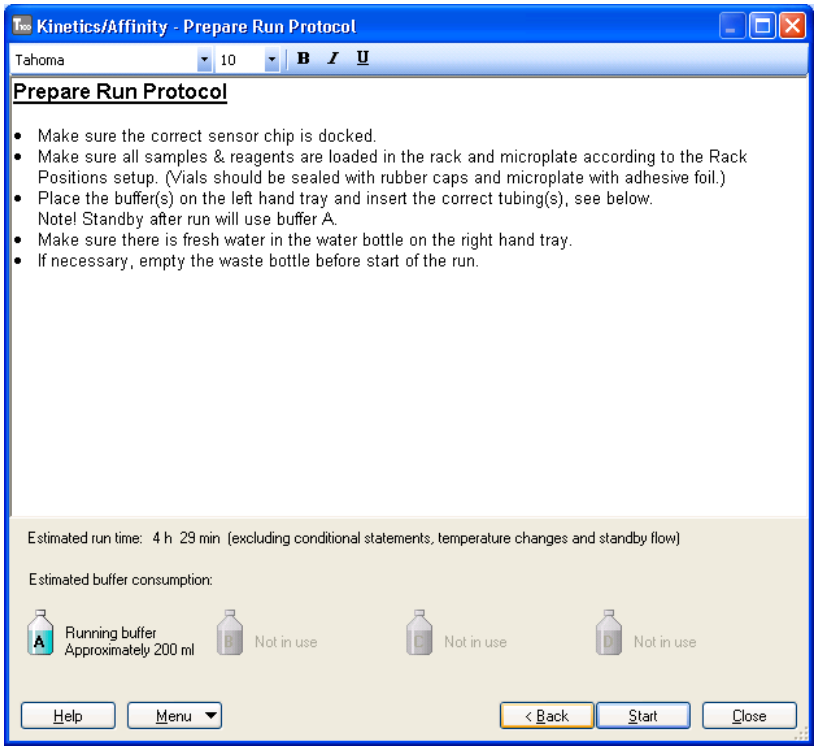
同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックする。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

↓

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。
ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。
Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックする。

↓

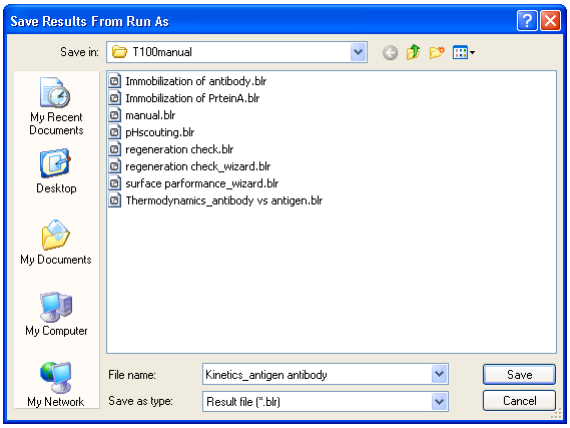

Kinetics/Affinity - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 4 h 29 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
A
Running buffer
Approximately 200 ml
B
Not in use
C
Not in use
D
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、固定化時間、必要なランニング緩衝液量が表示される。
Start をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。
保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする

↓

終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

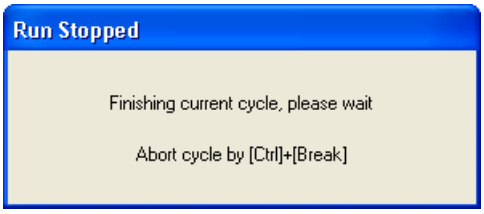
測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示される。

補足 5-5. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックする。

ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

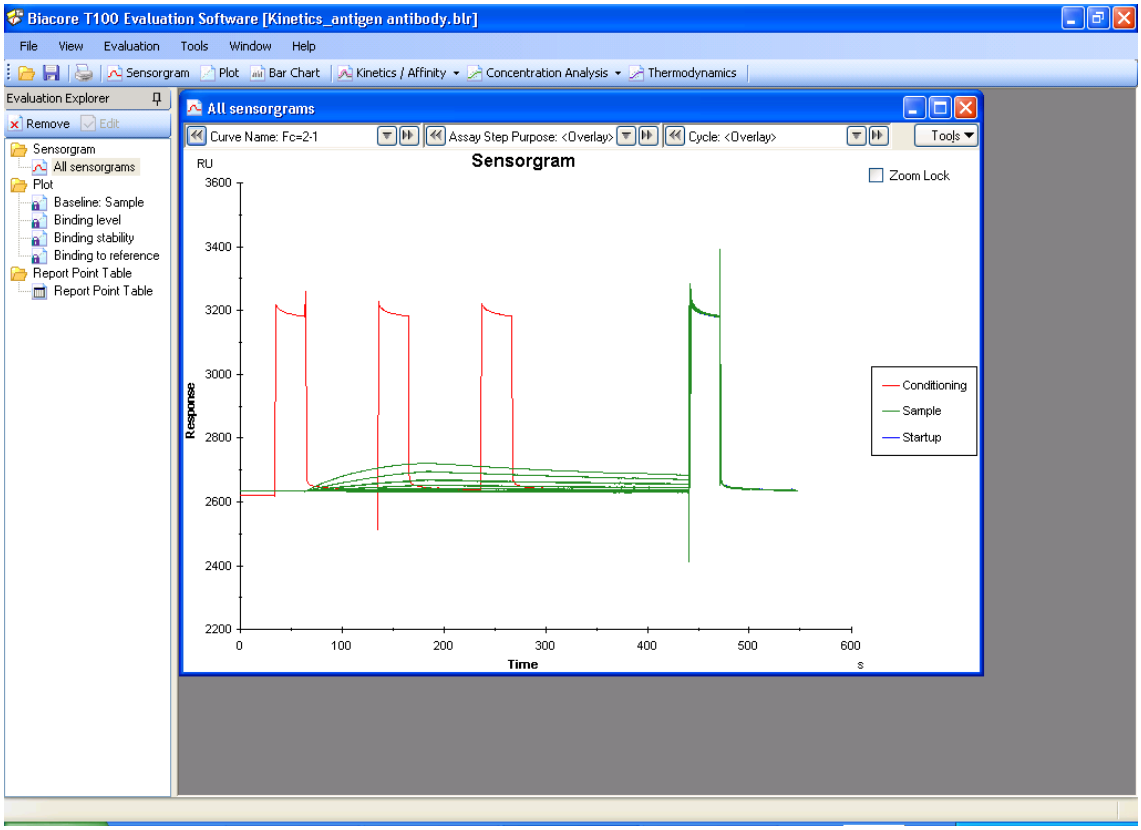
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

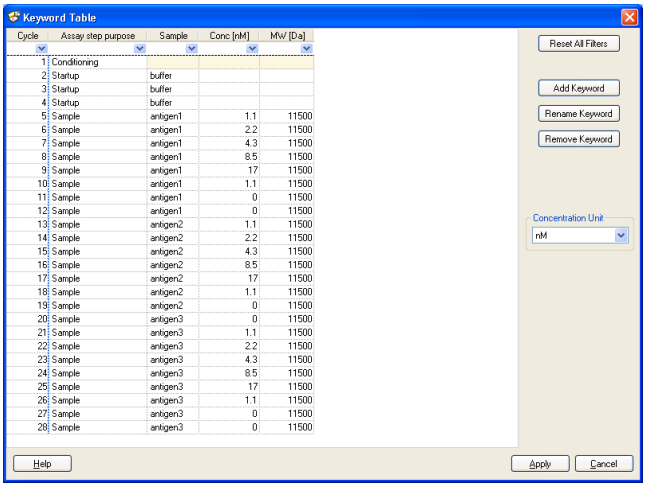
5-1-2. カーブフィッティングによる解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、自動保存された取得データが開かれる。

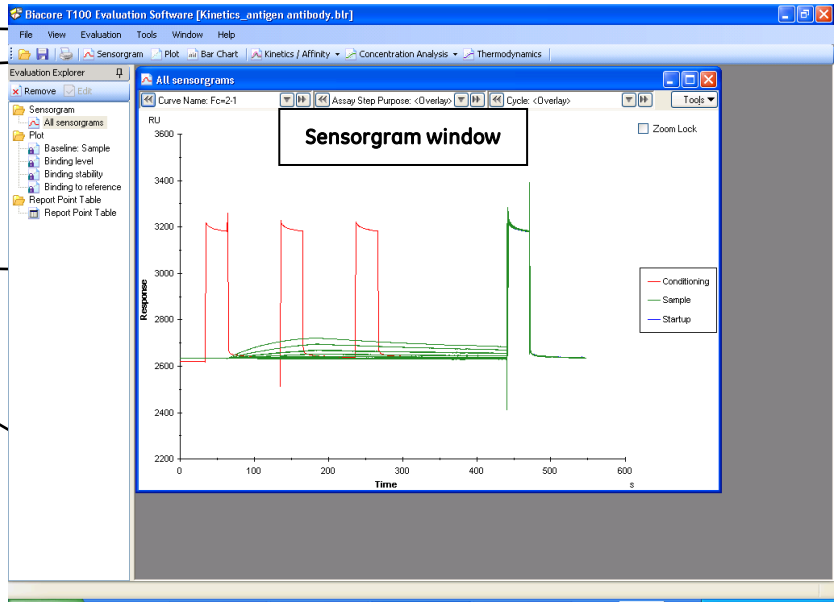


補足 5-6. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table...**で変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。



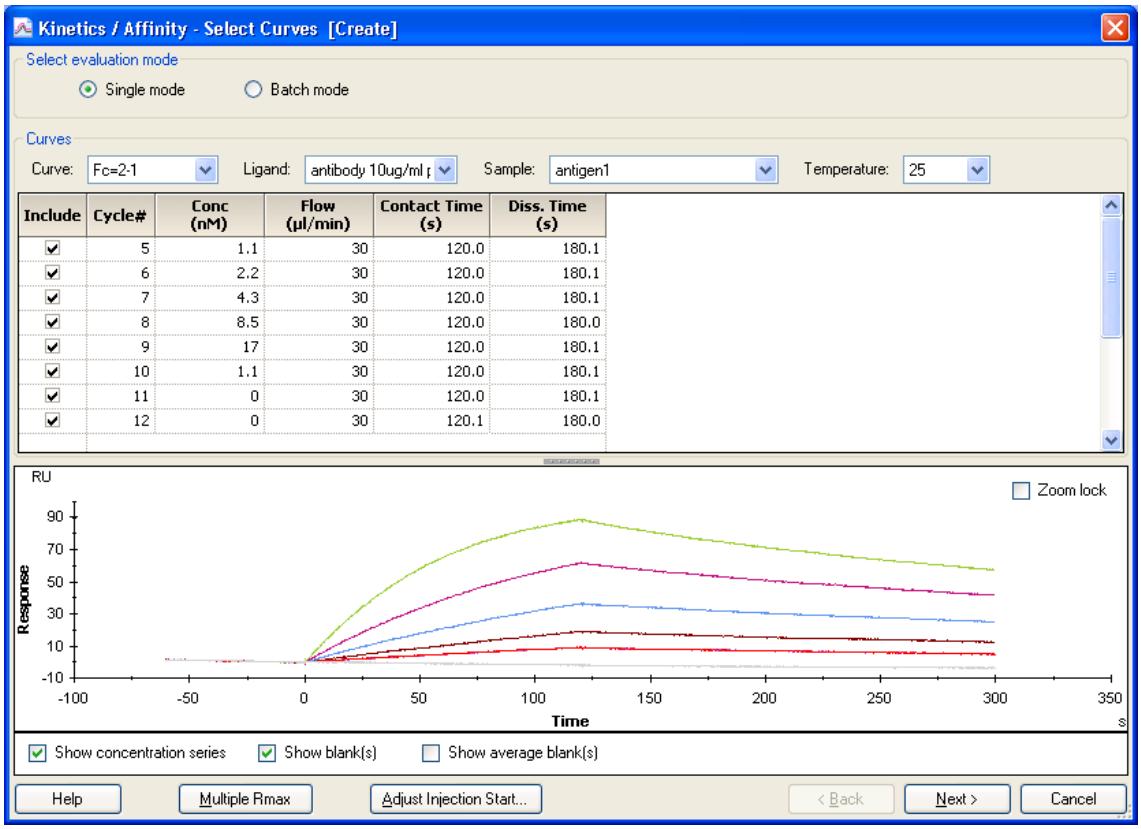
補足 5-7. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Kinetics / Affinity をクリック後、Surface bound をクリックする。

↓



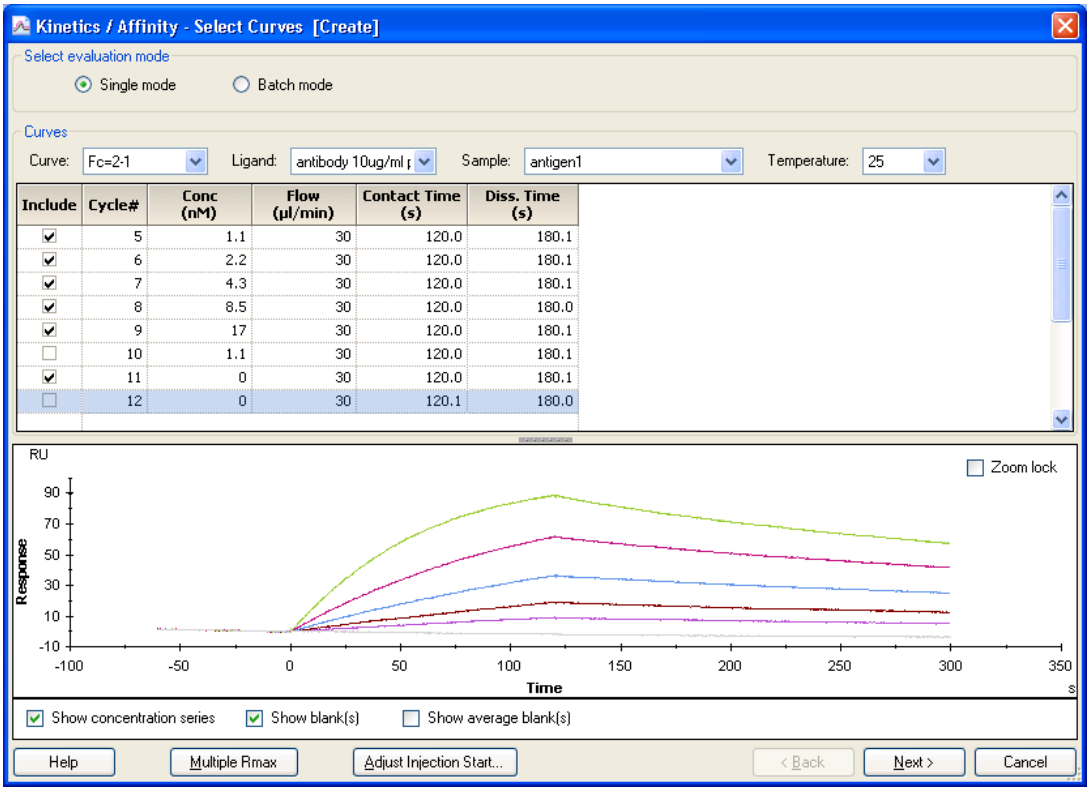
同一サンプル名のセンサーグラムがすべて重ね書き表示される。

Select Evaluation mode で解析方法を選択する。1 サンプルごとに解析をおこなう場合には、**Single mode** を選択する。複数サンプルをバッチ解析する場合は、**Batch mode** を選択する。**Bath mode** については、補足 5-14 を参照。

複数のサンプルについて同時測定している場合は、Sample:右側の をクリックすると、別サンプルのデータに移行できる。

ゼロ濃度のブランクサイクルを複数回測定している場合、センサーグラム下の **Show average blank（s）**にチェックを入れると、平均したセンサーグラムが表示される。

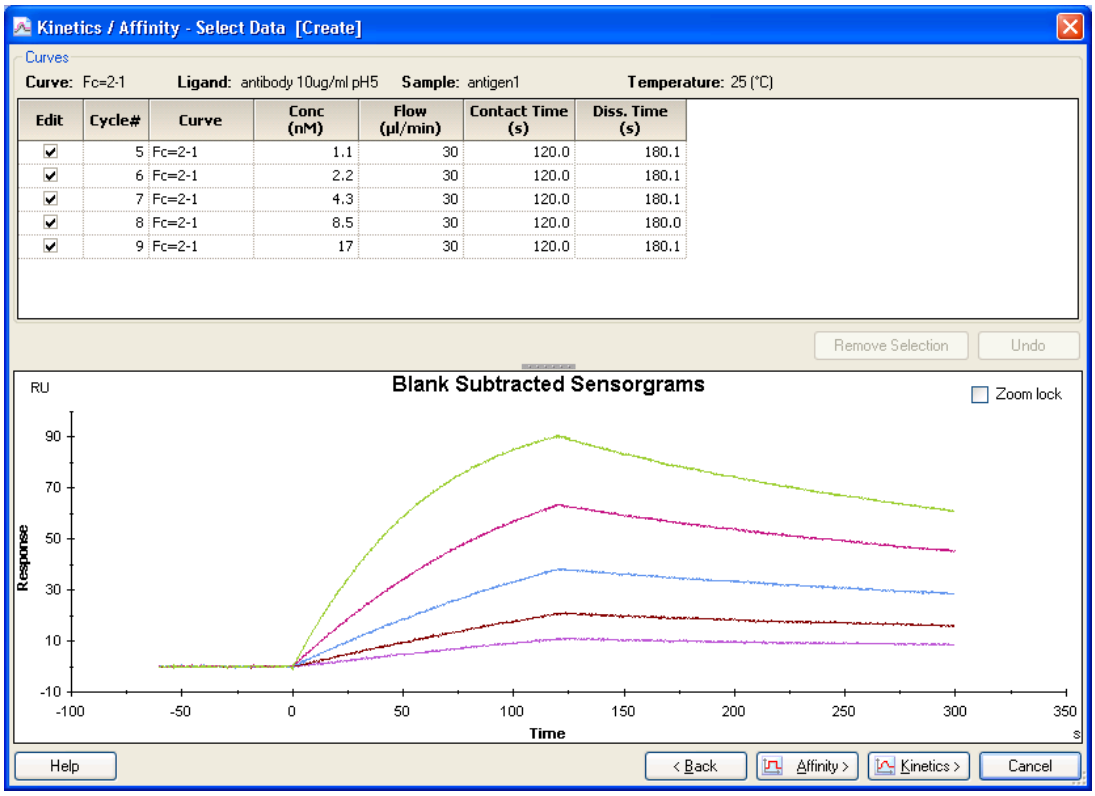
エアーの混入などの理由で、解析データから削除したいセンサーグラムがある場合は、そのセンサーグラムについて、テーブル中の Include カラムのチェックを外す。



自動的にテーブル下のチャートから、チェックを外したセンサーグラムは消える。

Next >をクリックする。

↓

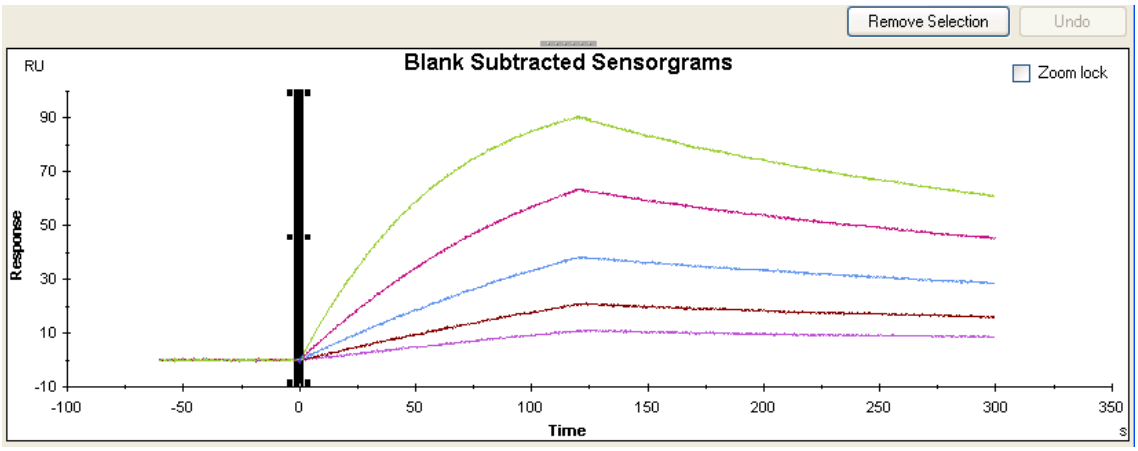


濃度 0 のセンサーグラムが、ブランクとして、全センサーグラムから差し引かれる。
Kinetics >をクリックする。

↓

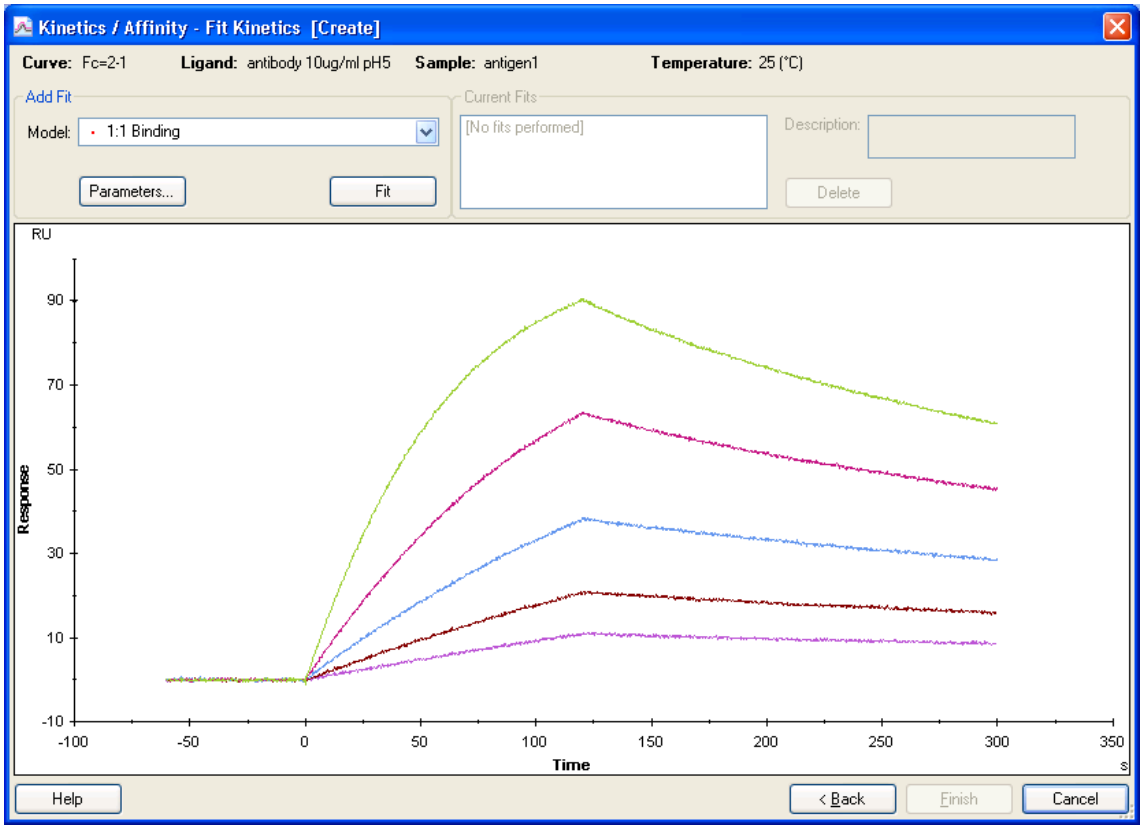
補足 5-8. センサーグラムの部分的削除

エアーの混入や添加開始・終了点のノイズなど、解析データの中から一部削除したい領域がある場合には、マウスの右ボタンをドラッグし該当の領域を拡大したのち、マウスの左ボタンをドラッグして削除する領域を選択する。拡大図を解除する場合は、センサーグラムを含まない余白をダブルクリックすると、一つ前の縮小画面に戻る。

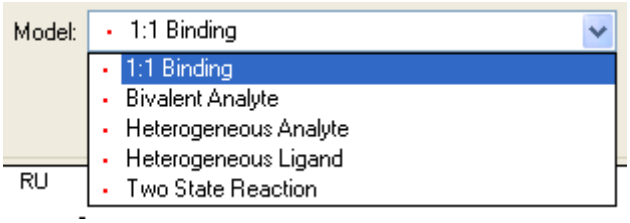


領域を選択すると、グラフの右上の **Remove Selection** ボタンがアクティブになる。ボタンをクリックすると選択部位が削除される。

↓



Model:に、フィッティングに採用する反応モデル式を選択する。▼をクリックすると、すべての反応モデルが表示される。反応モデルが不明な場合は、1:1 Binding を選択する。



選択後、**Fit** をクリックする。

↓

補足 5-9. 反応モデル

リガンドを B、アナライトを A とする。

1:1 Binding　　**A + B ⇔ AB**

リガンドとアナライトが 1 分子同士で結合するもっとも単純な反応モデル。

Bivalent Analyte　　**A + B ⇔ AB , AB + B ⇔ AB2**

アナライトが 2 価もしくはホモ 2 量体の反応モデル。AB 複合体形成後、リガンド B が 2 次的に結合する反応。

Heterogeneous Analyte　　**A1 + B ⇔ A1B , A2 + B ⇔ A2B**

競合反応。リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合する反応。

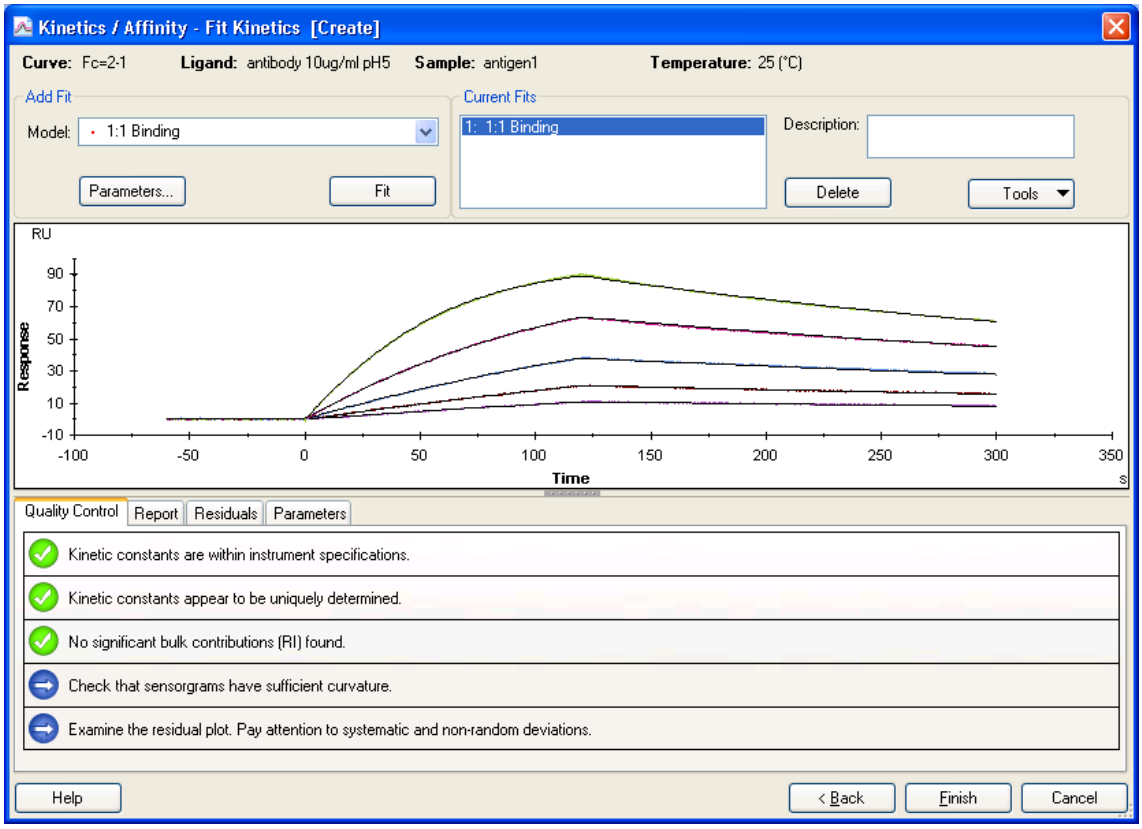
Heterogeneous Ligand　　**A + B1 ⇔ AB1 , A + B2 ⇔ AB2**

アナライトに対して親和性の異なる 2 つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並行して結合する反応モデル。

Two state Reaction　　**A + B ⇔ AB ⇔ AB***

リガンドとアナライトの 1 分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメーション変化を起こす反応モデル。

解析結果が表示される。



黒色のセンサーグラムは、フィッティングにより得られたフィッティングカーブである。1:1 binding で解析をおこなった場合には、**Quality Control** テーブルが表示され、解析結果の評価が表示される。補足 5-10 参照。

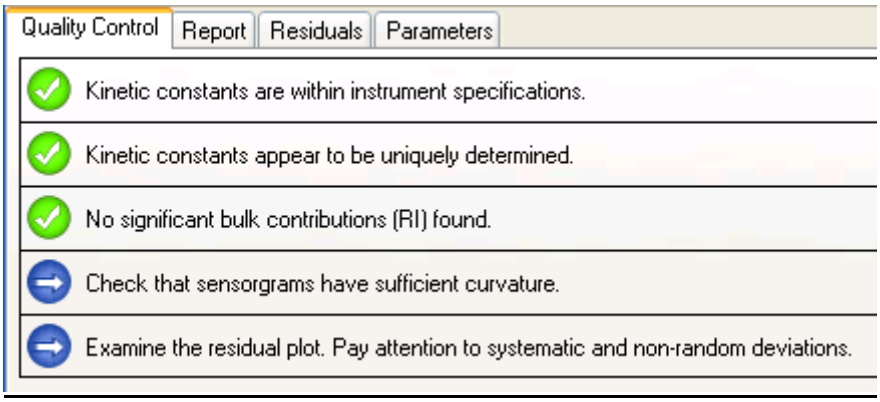
補足 5-10. 解析結果の Quality Control

5 項目の品質評価結果が、ステータスマークで表示される。

ステータスマーク

- クオリティーアセスメントにパスしている。
- クオリティーアセスメントの許容限界に近い。
- クオリティーアセスメントにパスしていない。
- ニュートラルまたは各自で確認が必要。

品質評価基準



①速度定数はシステムのスペック範囲内か？

スペック範囲　　k_a = 10^3～10^7 (1/Ms)、k_d = 10^{-5}～0.5 (1/s)

②各パラメータは独立して算出されているか？

k_a、k_d および R_{max} について解析結果に与える、パラメータ間の相関性を確認している。マストランスポートリミテーション下で測定した結果は、k_a、k_d に相関性が見られる。

③溶液効果の値（RI）の妥当性は？

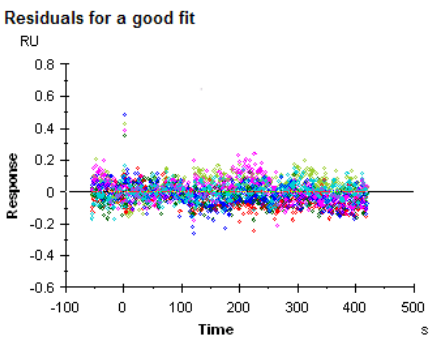
リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引いている場合には、RI は限りなくゼロとなるが、結合・解離速度が速くセンサーグラムが箱型の場合には、RI の値が大きく算出され、解析結果へ影響を与える。

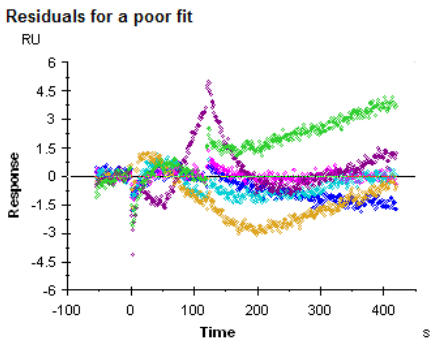
④センサーグラムはカーブを描いているか？

センサーグラムの結合・解離領域が直線的な場合には、良好なフィッティングをおこなうことができない。

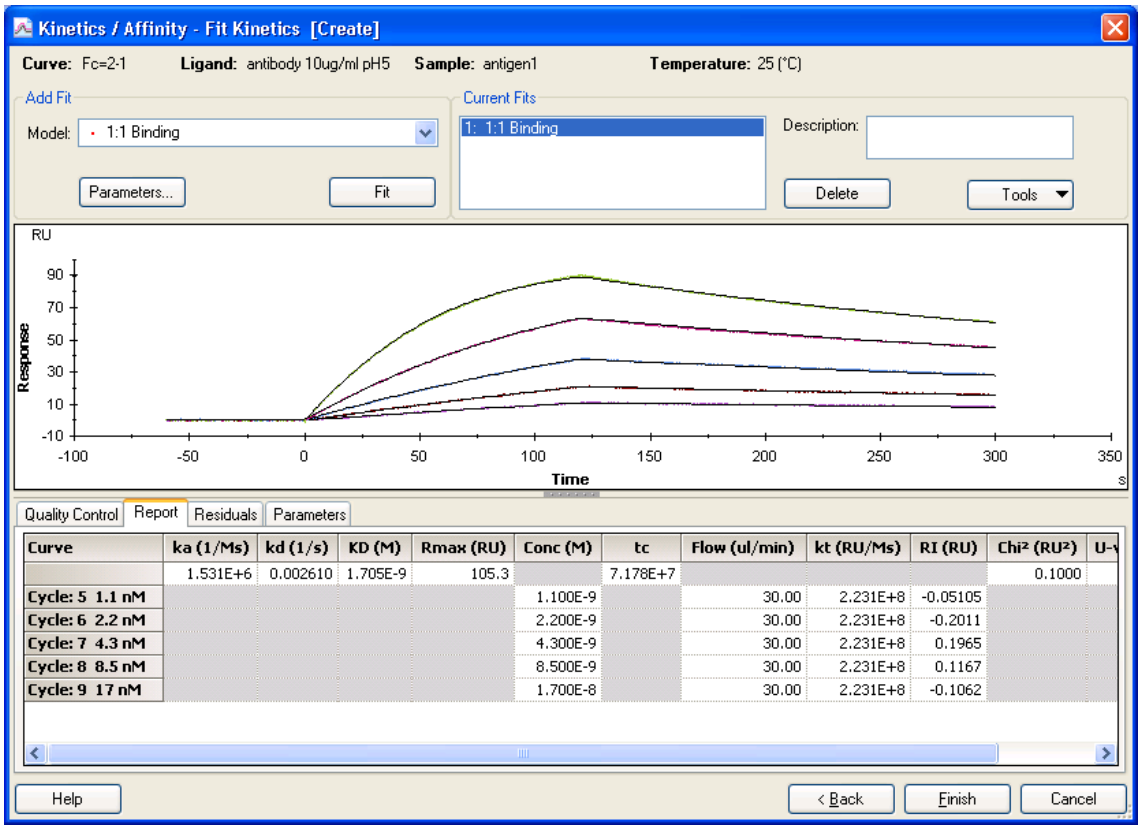
⑤フィッティングカーブに対して測定プロットは、ランダムに分散しているか？

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認する。Y 軸のゼロ近傍で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できる。ランダムに分散していない場合には、良好なフィッティング結果ではない。





Report タブをクリックすると、算出された各種パラメータが表示される。



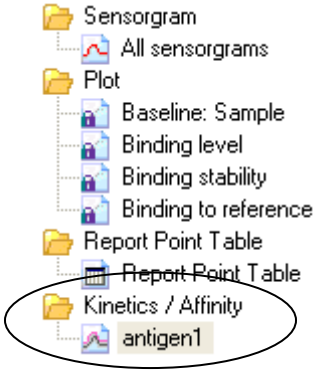
Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)	U-v
	1.531E+6	0.002610	1.705E-9	105.3		7.178E+7				0.1000	
Cycle: 5 1.1 nM					1.100E-9		30.00	2.231E+8	-0.05105		
Cycle: 6 2.2 nM					2.200E-9		30.00	2.231E+8	-0.2011		
Cycle: 7 4.3 nM					4.300E-9		30.00	2.231E+8	0.1965		
Cycle: 8 8.5 nM					8.500E-9		30.00	2.231E+8	0.1167		
Cycle: 9 17 nM					1.700E-8		30.00	2.231E+8	-0.1062		

k_a （1/Ms）	結合速度定数
k_d （1/s）	解離速度定数
K_D （M）	解離定数
R_{max} （RU）	アナライトの最大結合量
RI （RU）	溶液効果（bulk effect）
Chi^2 （RU^2）	カイ二乗
U-value	U-バリュー

Finish をクリックする。

↓

上記解析結果は、画面左端の **Evaluation Explorer** 中のフォルダに追加される。ファイル名にはサンプル名が自動的に採用される。



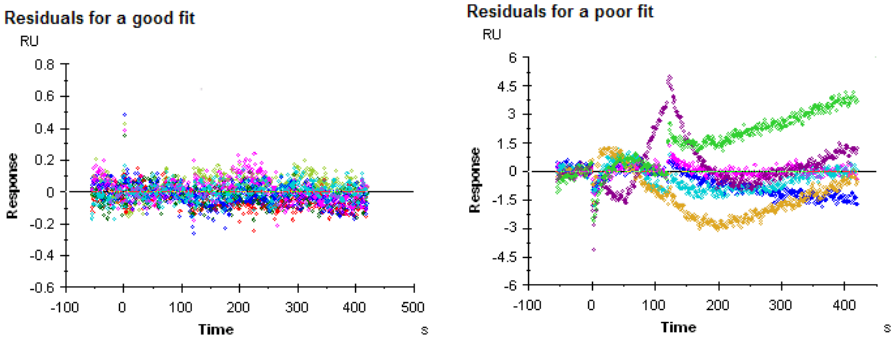
引き続き、同時に測定した別のサンプルについて解析する場合は、Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックする。

補足 5-11. フィッティング結果の評価

フィッティングが良好な場合、センサーグラムとフィッティングによって得られたフィッティングカーブがほぼ重なる。特に、センサーグラムの傾きが大きく異なる場合、フィッティングは良好ではないと判断する。また、解析結果の RI 値が 0（RU）に近いか確認する。統計学的には、以下の各項目を確認する。

Residual

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認する。Y 軸のゼロ近傍で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できる。



Chi² 値

測定データとフィッティングカーブ間の差を示す。良好なフィッティングでは、シグナルノイズの平均平方値に一致する。

U-value

解析値が信頼できるか否かを判断する値。15 以下であれば問題ない。25 以上の場合には、算出された値の信頼性は低い。

SE （Standard error）

Parameters タブをクリックすると、各パラメータについて SE（標準誤差）が表示される。各パラメータの解析結果に対して、SE の値が 10%以下であれば問題ない。

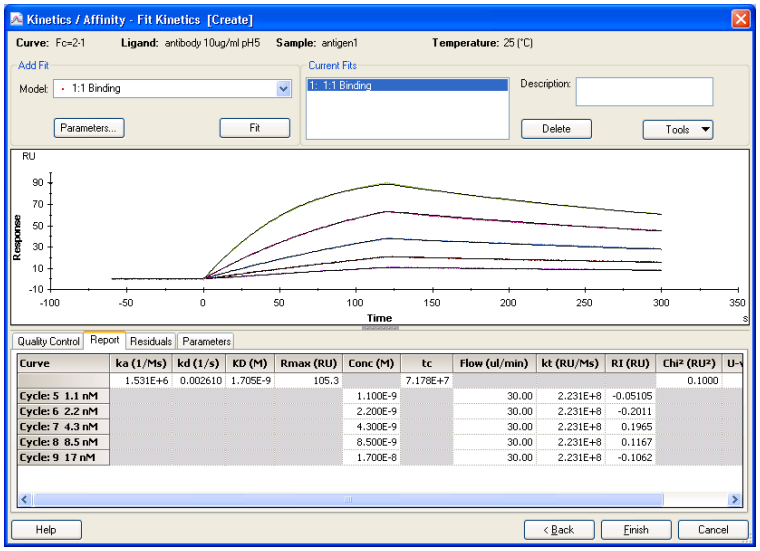
フィッティングが良好ではない要因

①フィッティングに採用したモデルが異なっている
②箱型のセンサーグラムである
③経時的なリガンドの活性低下が考えられる
④再生が不十分である
⑤アナライト濃度の調製ミスが考えられる　等

①が要因と考えられる場合は、再度妥当な反応モデルを選択し解析する。
②が要因の場合、解析結果の RI がセンサーグラムのレスポンスの大半を占める値になることがある。これは、結合解離領域の急激なレスポンスの変動を RI とみなしてしまうからである。この場合は、RI=0 （Constant）として再解析する必要がある。
複数濃度のセンサーグラムから 1 つの定数を算出する解析方法では、すべての濃度のセンサーグラムにおいて k_a, k_d, R_{max} が同一のパラメータであることが前提となる。しかし、上記③～⑤の実験状況では、各濃度のセンサーグラムにおいて、これらのパラメータは必ずしも一致しない。
例えば、R_{max} は、リガンドに対するアナライトの最大結合量（RU）であり、理想的な実験系では、連続して同一セルを使用している限り、どの濃度のセンサーグラムに対しても同一値である。ところが、リガンドの再生が不十分な場合や、再生操作によりリガンドの活性がサイクルごとに低下している場合には、R_{max} はサイクルごとに低下する。フィッティングが良好でない要因が、測定結果から明らかに R_{max} にある場合は、R_{max} が同一パラメータであることを解除し再解析する。

補足 5-12. カーブフィッティングにおける再解析

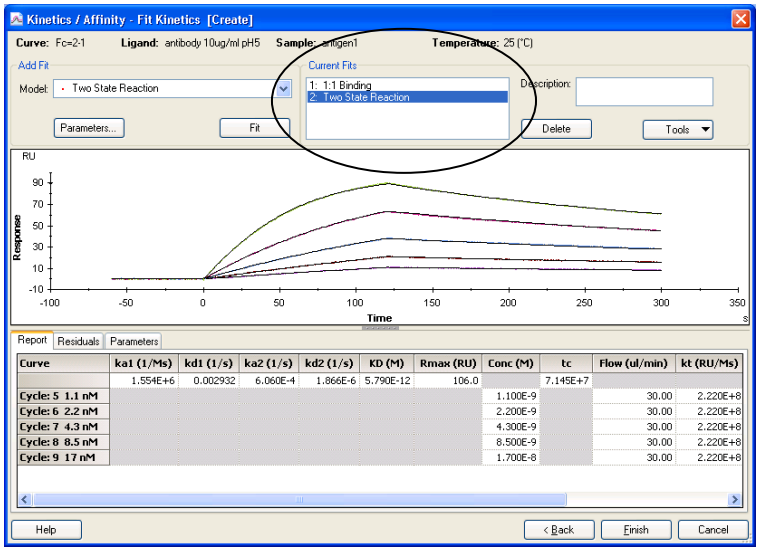
反応モデルの変更



反応モデルを変更し再解析する場合は、**Finish** をクリックせず、**Add Fit** ボックスの **Model:** 右側の▼をクリックし、新しい反応モデルを選択する。**Fit** をクリックする。

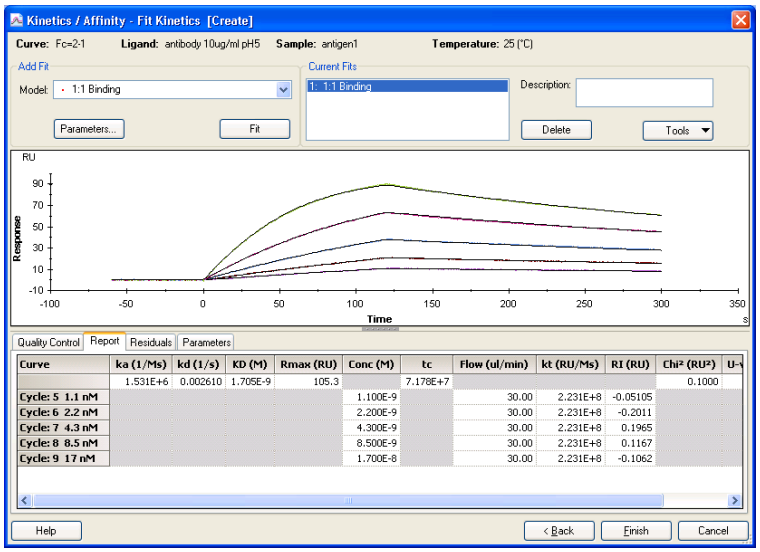
↓

新しい解析結果が表示される。



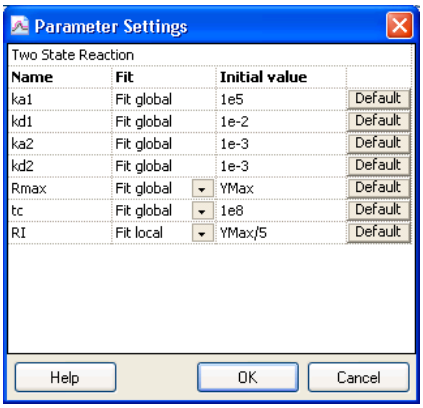
解析したすべての結果は、履歴として、**Current Fits** ボックスに残る。
前の解析結果を見る場合は、**Current Fits** ボックスの目的の反応モデルをクリックすると結果が表示される。終了後、**Finish** をクリックする。

解析パラメータの解析設定条件の変更



解析パラメータ（R_{max} ,RI）の解析設定条件を変更し再解析する場合は、**Add Fit** ボックスの **Parameters** をクリックする。

↓



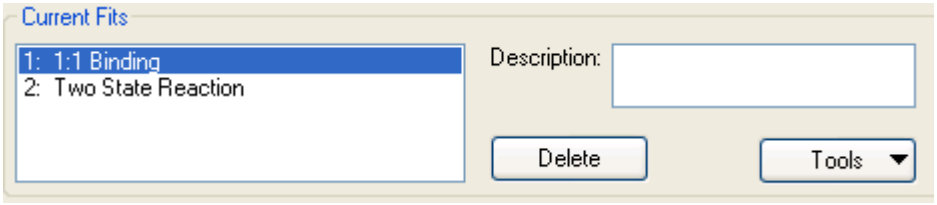
経時的なリガンドの活性低下や再生の不十分さが原因で、全センサーグラムにおいて、R_{max} を同一パラメータとみなせない場合、R_{max} の行の **Fit** カラムの▼をクリックし、**Fit local** を選択する。

箱型のセンサーグラムを解析する際に、濃度 0 のセンサーグラムを差し引いているにもかかわらず、センサーグラムの急激なレスポンスの変化を RI としてみなしてしまう場合、RI の **Fit** カラムの▼をクリックし、**Constant** を選択する。Initial value は自動的に 0 が入力される。

Parameter Setting ダイアログ中の **OK** をクリックすると、条件が適用される。
引き続き、**Fit** をクリックすると解析結果が表示される。

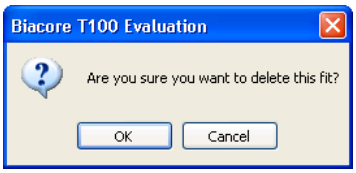
補足 5-13. 解析履歴からの結果の消去

解析結果を履歴から消去する場合は、**Current Fits** ボックス中の目的のデータを選択する。



Delete をクリックする。

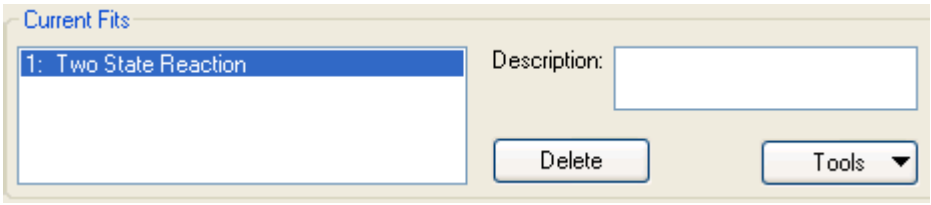
↓



確認ダイアログが表示される。

消去する場合は **OK** をクリックする。

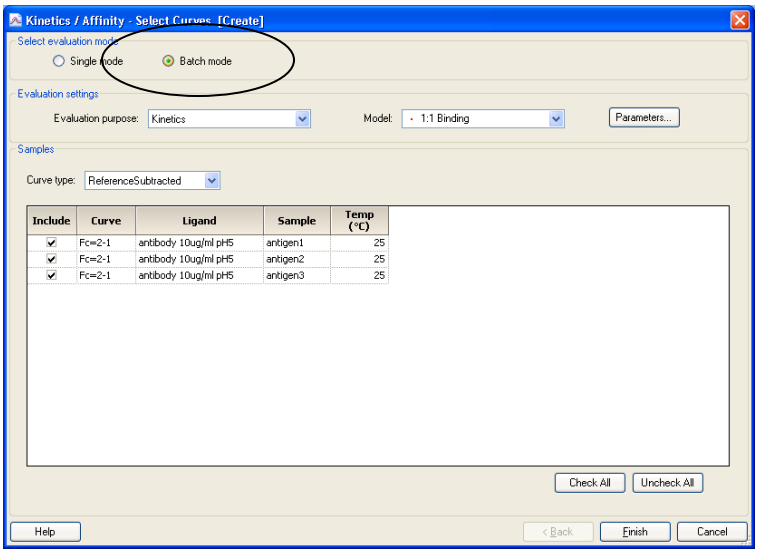
↓



解析結果が消去される。

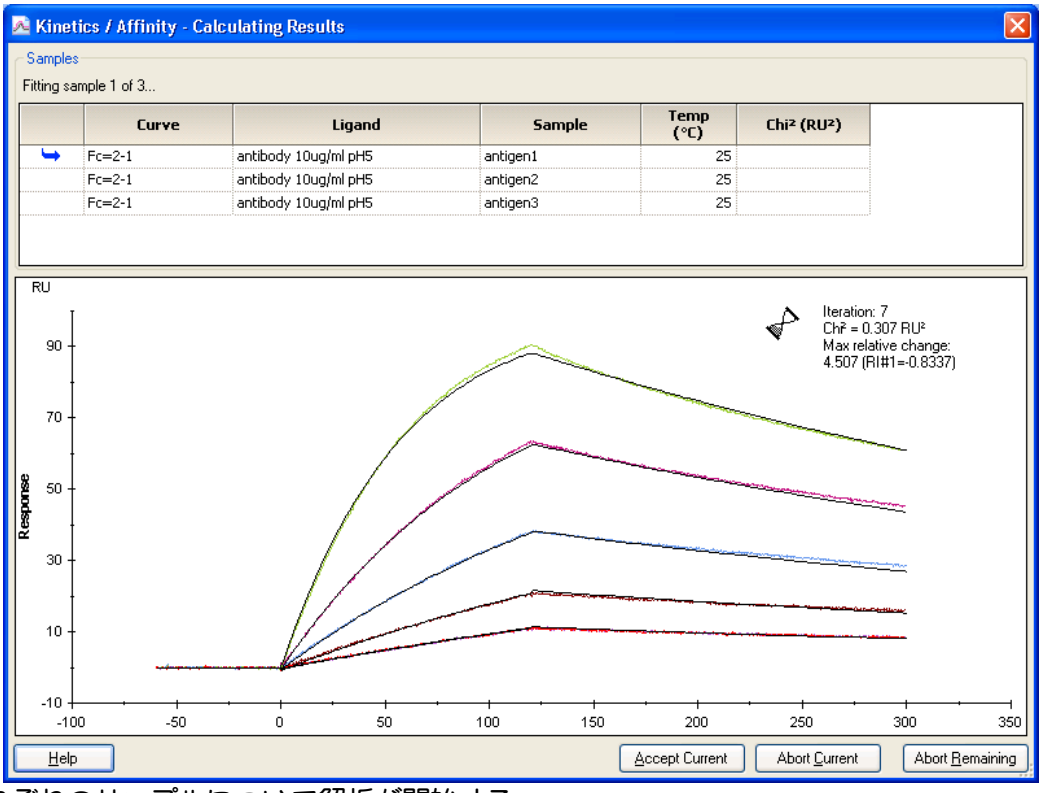
補足 5-14. Batch mode による解析方法

複数のサンプルについて同時に解析したい場合には、Select Evaluation mode で、Batch mode を選択する。なお、Batch mode では、各サンプルについて解析に利用するセンサーグラムの選択は行わない。

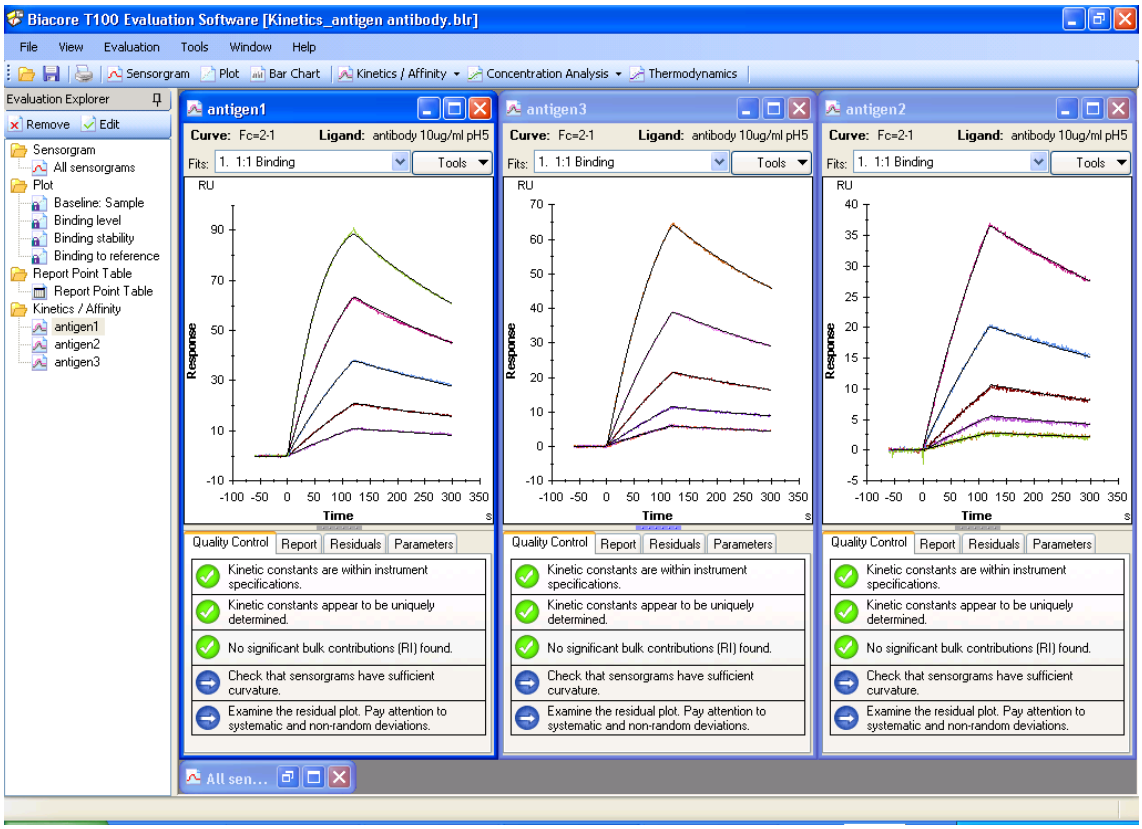


Samples に測定サンプルの一覧が表示される。Evaluation purpose と Model を選択する。解析に利用するサンプルにチェックを入れる。

↓



それぞれのサンプルについて解析が開始する。



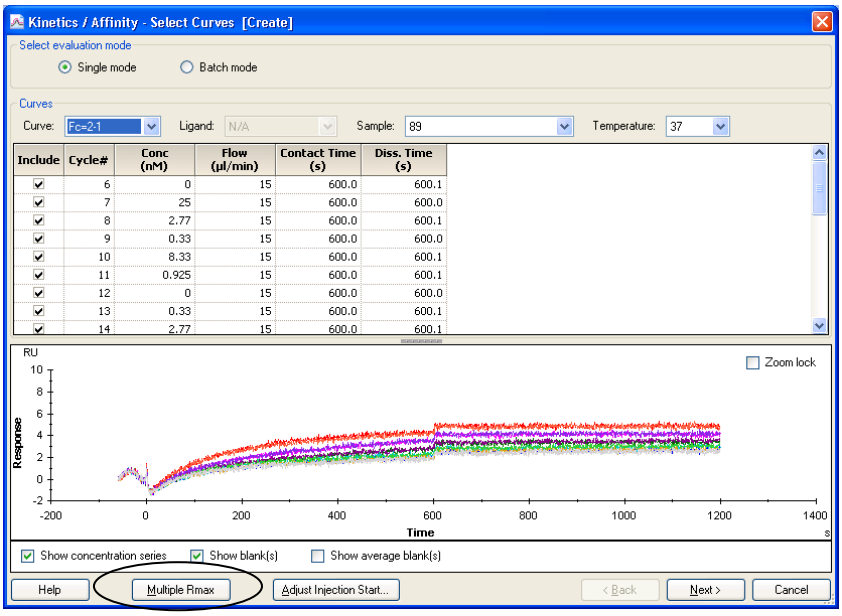
解析結果が表示される。

各ウィンドウを並べて表示させたい場合には、ツールバーの **Window > Tile Horizontally** または **Tile Vertically** を選択する。

画面左端の **Evaluation Explorer** 中のフォルダにそれぞれの解析結果が追加される。ファイル名にはサンプル名が自動的に採用される。

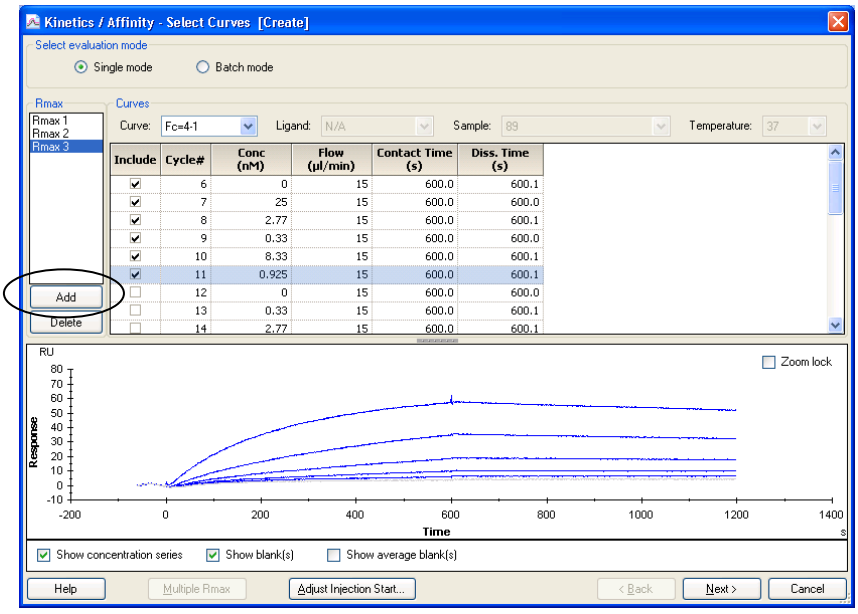
補足 5-15. Multiple R_{max} を用いた解析方法

同一サンプルにおいて、固定化量が異なるセンサーグラムを同時に解析して、1 つの解析結果を算出することができる。解析に利用するセンサーグラムは、同一温度で測定した、同一濃度系列のものを利用すること。



Select Curves [Create]ウインドウで、**Multiple R_{max}** をクリックする。

↓

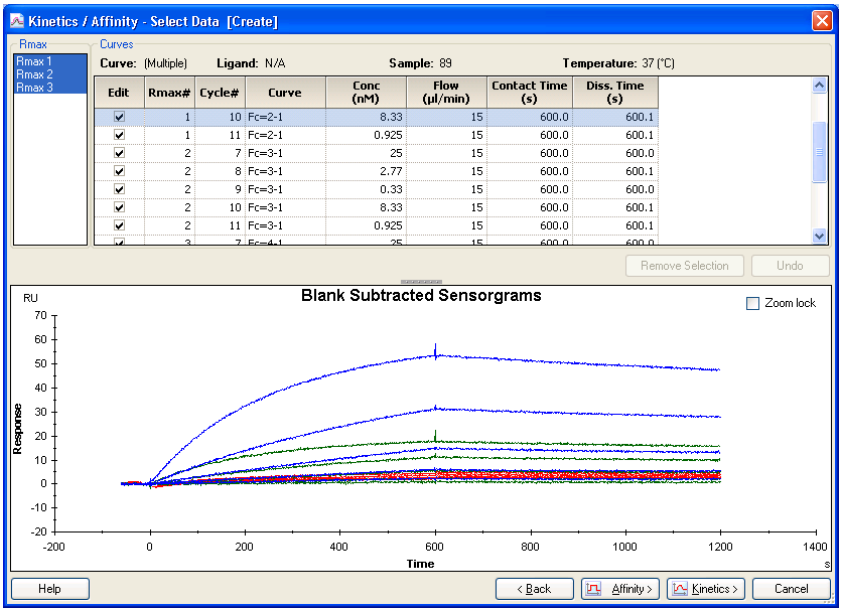


Curve でセンサーグラムを選択し、**Add** をクリックすると、解析に利用するセンサーグラムがウインドウ左上の **R_{max}** の一覧に追加される。最大、5 つまで追加可能。

ウインドウ右上の **Curves** の **Include** で解析に持ち込むセンサーグラムを選択する。

Next >をクリックする。

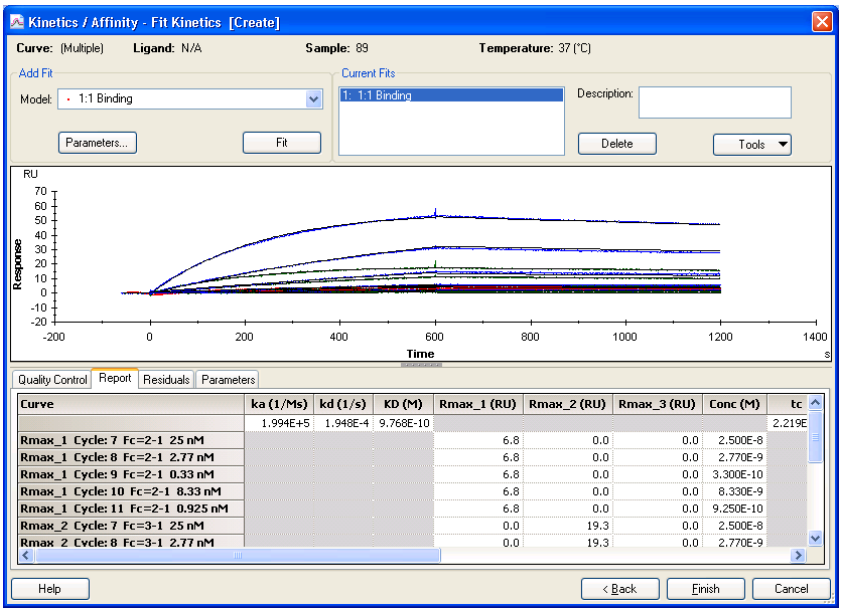
↓



Kinetics >をクリックする。

↓

モデルを選択後、**Fit** をクリックする。



解析結果が表示される。

R_{max} は固定化量ごとに、Fit global で算出される。

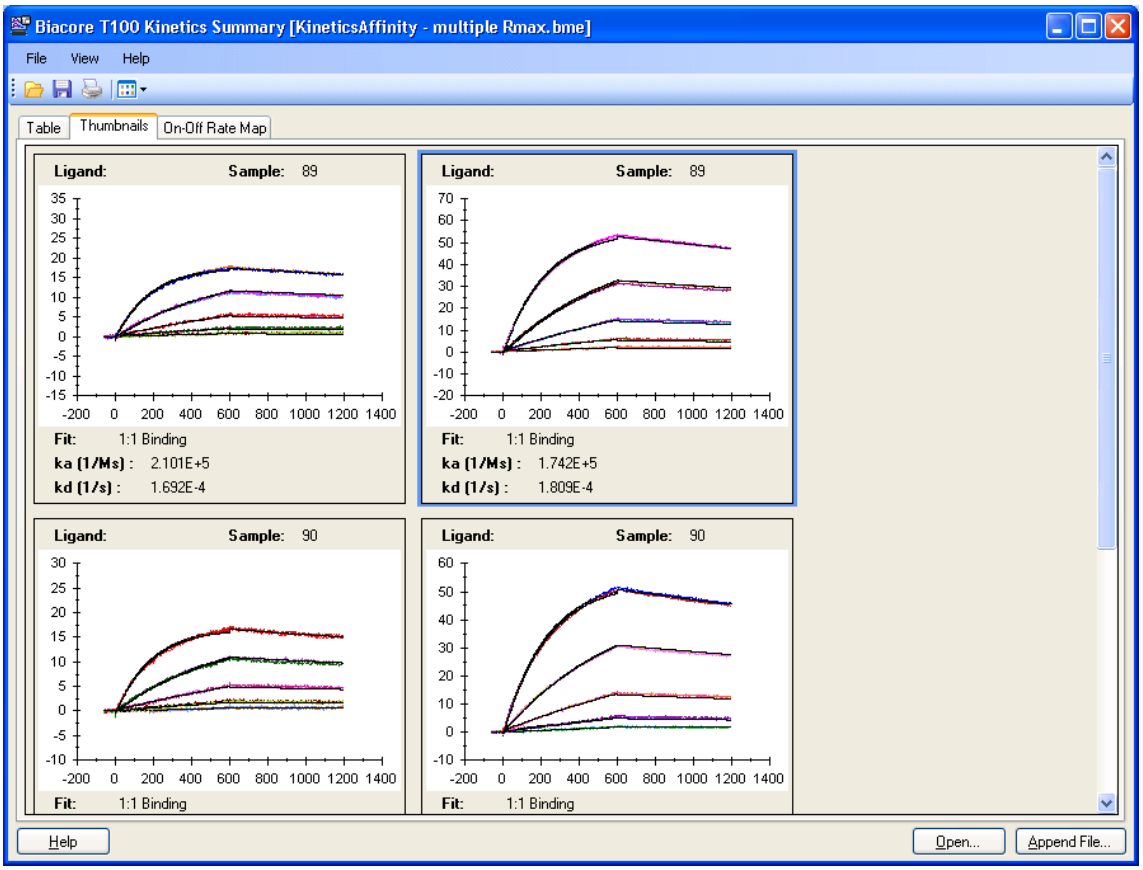
補足 5-16. 反応速度定数のマッピング

各サンプルにおける反応速度定数の解析結果を、Y 軸=k_a、X 軸=k_d のチャートに自動マッピングすることができる。Biacore T100 Kinetics Summary にデータを持ち込む場合には、事前に解析データを保存しておく。

Tools → **Kinetics Summary** をクリックする。

↓

Biacore T100 Kinetics Summary が起動し、**Thumbnails** に、解析ソフトウェアで解析したすべての結果が読み込まれる。



↓

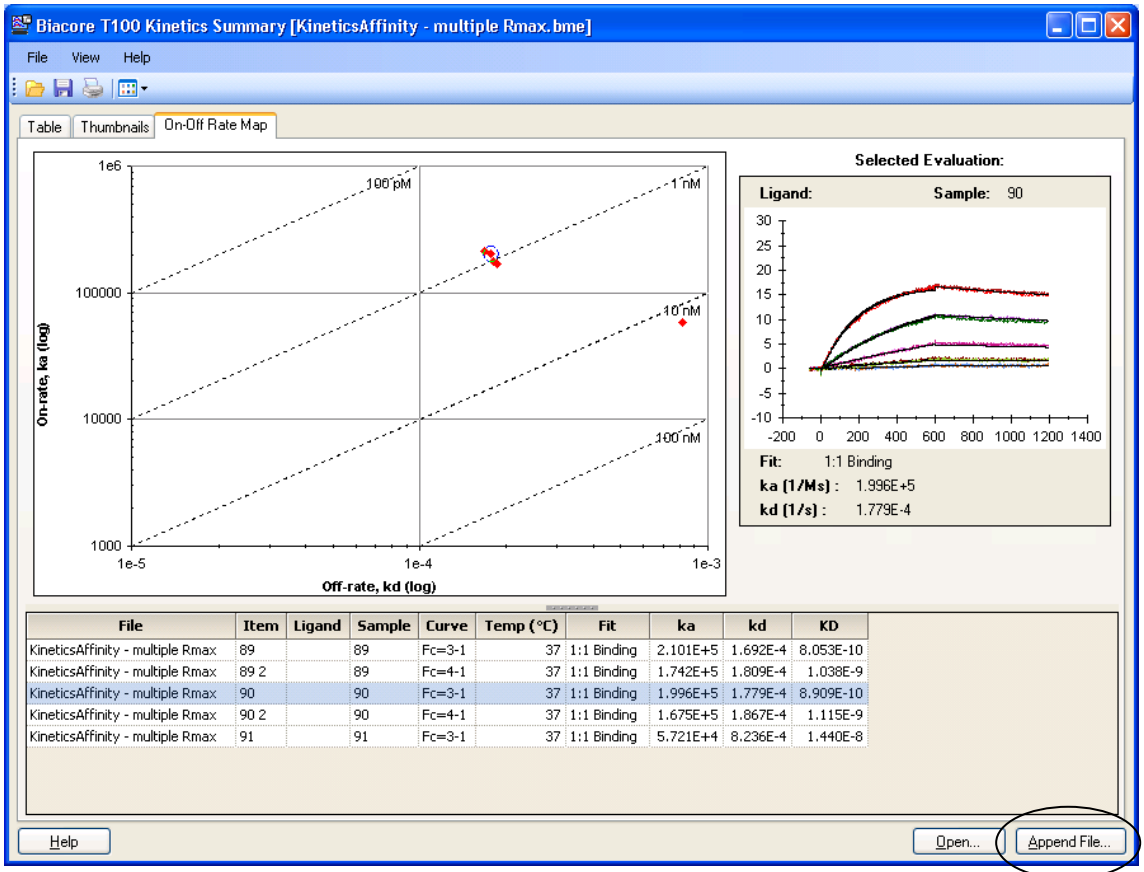
Table タブをクリックして、**Include** をチェックして、プロットするデータを選択する。

Table | Thumbnails | On-Off Rate Map

Include	File	Item	Ligand	Sample	Curve	Temp (°C)	Fit	ka	kd	KD
☑	KineticsAffinity - multiple Rmax	89		89	Fc=3-1	37	1:1 Binding	2.101E+5	1.692E-4	8.053E-10
☑	KineticsAffinity - multiple Rmax	89 2		89	Fc=4-1	37	1:1 Binding	1.742E+5	1.809E-4	1.038E-9
☑	KineticsAffinity - multiple Rmax	90		90	Fc=3-1	37	1:1 Binding	1.996E+5	1.779E-4	8.909E-10
☑	KineticsAffinity - multiple Rmax	90 2		90	Fc=4-1	37	1:1 Binding	1.675E+5	1.867E-4	1.115E-9
☑	KineticsAffinity - multiple Rmax	91		91	Fc=3-1	37	1:1 Binding	5.721E+4	8.236E-4	1.440E-8
☑	KineticsAffinity - multiple Rmax	91 2		91	Fc=4-1	37	1:1 Binding	1975	3.749E-5	1.898E-8

↓

On-Off Rate Map タブをクリックする。プロットが表示される。



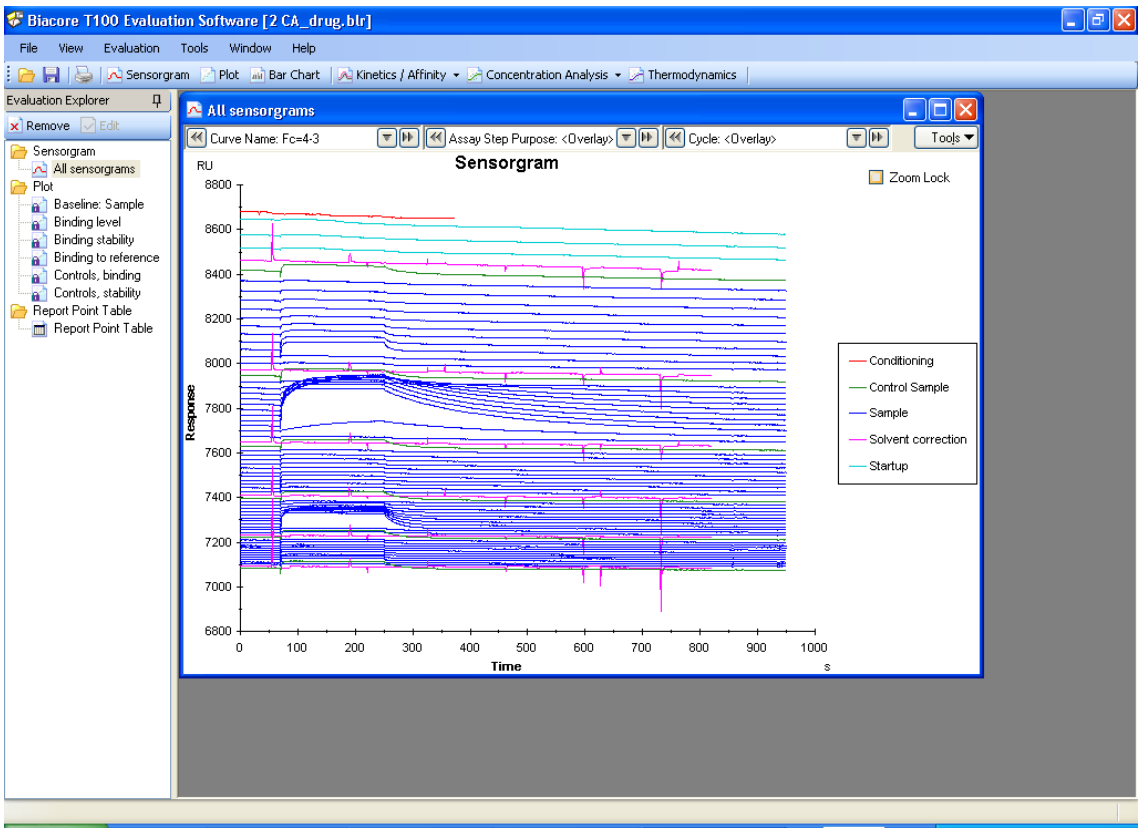
File	Item	Ligand	Sample	Curve	Temp (°C)	Fit	ka	kd	KD
KineticsAffinity - multiple Rmax	89		89	Fc=3-1	37	1:1 Binding	2.101E+5	1.692E-4	8.053E-10
KineticsAffinity - multiple Rmax	89 2		89	Fc=4-1	37	1:1 Binding	1.742E+5	1.809E-4	1.038E-9
KineticsAffinity - multiple Rmax	90		90	Fc=3-1	37	1:1 Binding	1.996E+5	1.779E-4	8.909E-10
KineticsAffinity - multiple Rmax	90 2		90	Fc=4-1	37	1:1 Binding	1.675E+5	1.867E-4	1.115E-9
KineticsAffinity - multiple Rmax	91		91	Fc=3-1	37	1:1 Binding	5.721E+4	8.236E-4	1.440E-8

ポイントをクリックすると、画面右に該当するセンサーグラムが表示される。

なお、別の解析データファイルの結果も同時にプロットしたい場合には、**Append File...**または **File** → **Append File...**をクリックして、該当データを読み込む。

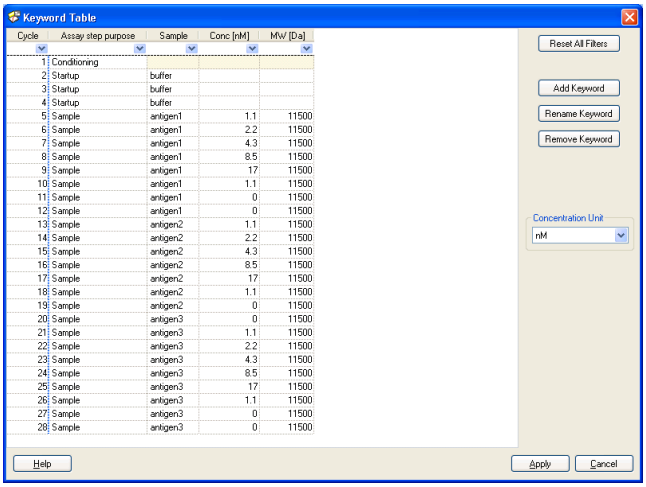
5-1-3. 平衡値解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。



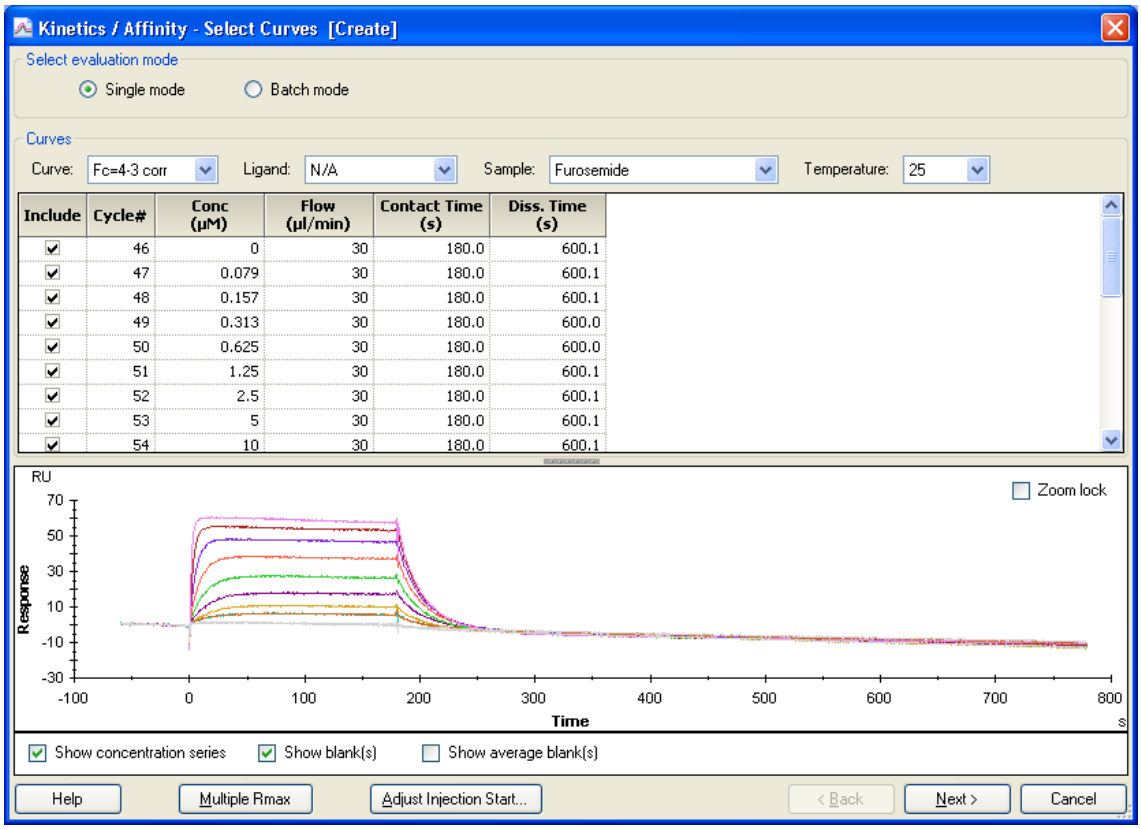
補足 5-17. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table...**で変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。



Toolbar の Kinetics / Affinity をクリック後、 Surface bound をクリックする。

↓



同一サンプル名のセンサーグラムが重ね書き表示される。

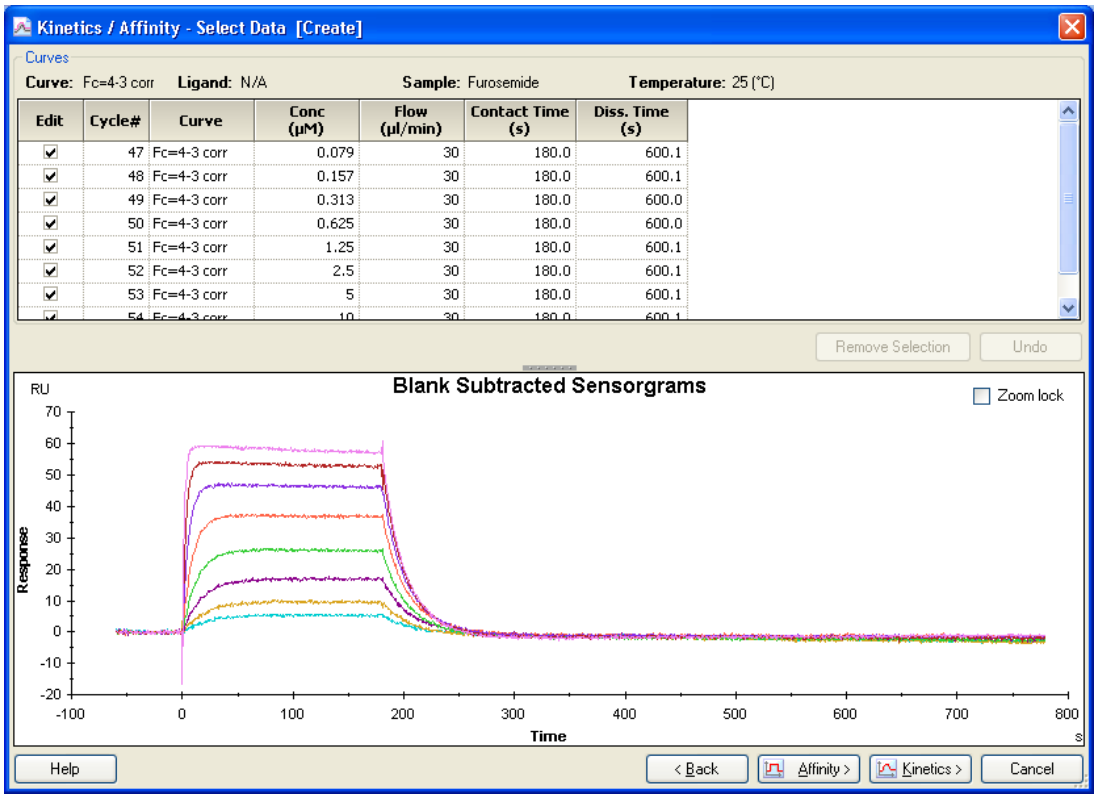
Select Evaluation mode で解析方法を選択する。1 サンプルごとに解析をおこなう場合には、**Single mode** を選択する。複数サンプルをバッチ解析する場合は、**Batch mode** を選択する。**Bath mode** については、補足 5-14 を参照。

複数のサンプルについて同時測定している場合は、Sample:右側の をクリックすると、別サンプルのデータに移行できる。

ゼロ濃度のブランクサイクルを複数回測定している場合、センサーグラム下の **Show average blank（s）**にチェックを入れると、平均したセンサーグラムが表示される。

エアーの混入などの理由で、解析データから削除したいセンサーグラムがある場合は、そのセンサーグラムについて、テーブル中の Include カラムのチェックを外す。
Next >をクリックする。

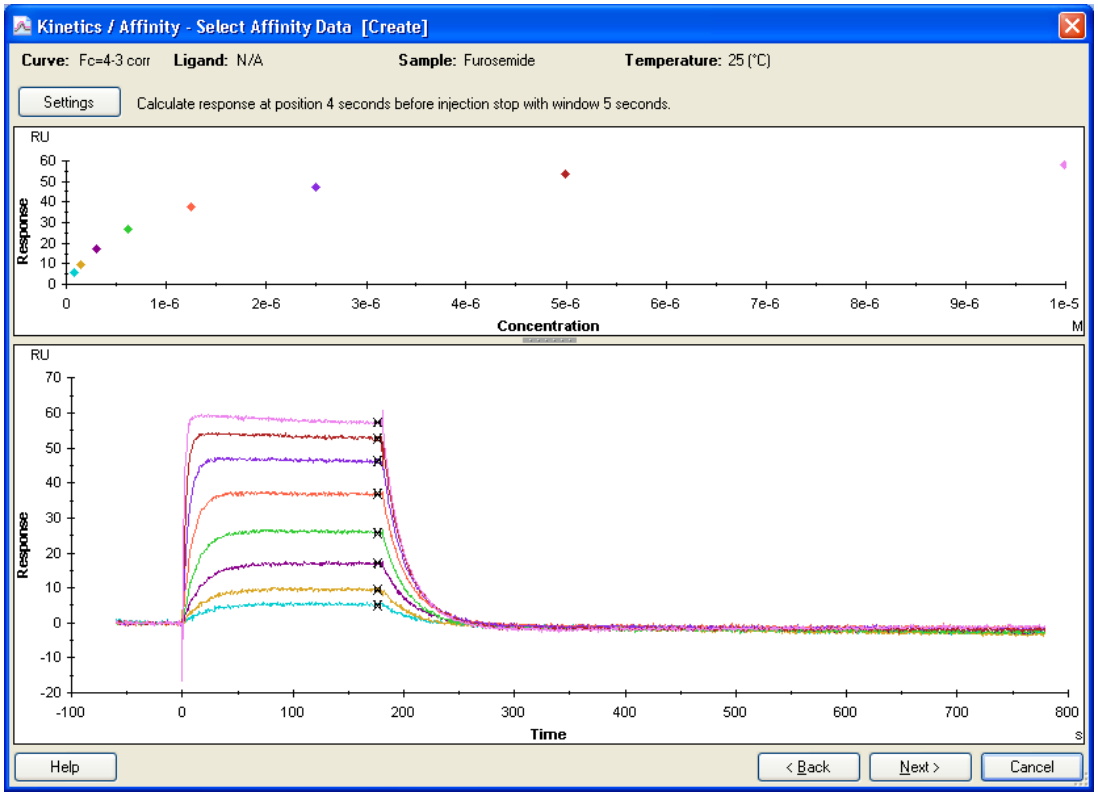
↓



ゼロ濃度のセンサーグラムがブランクとして、全センサーグラムから差し引かれる。

Affinity >をクリックする。

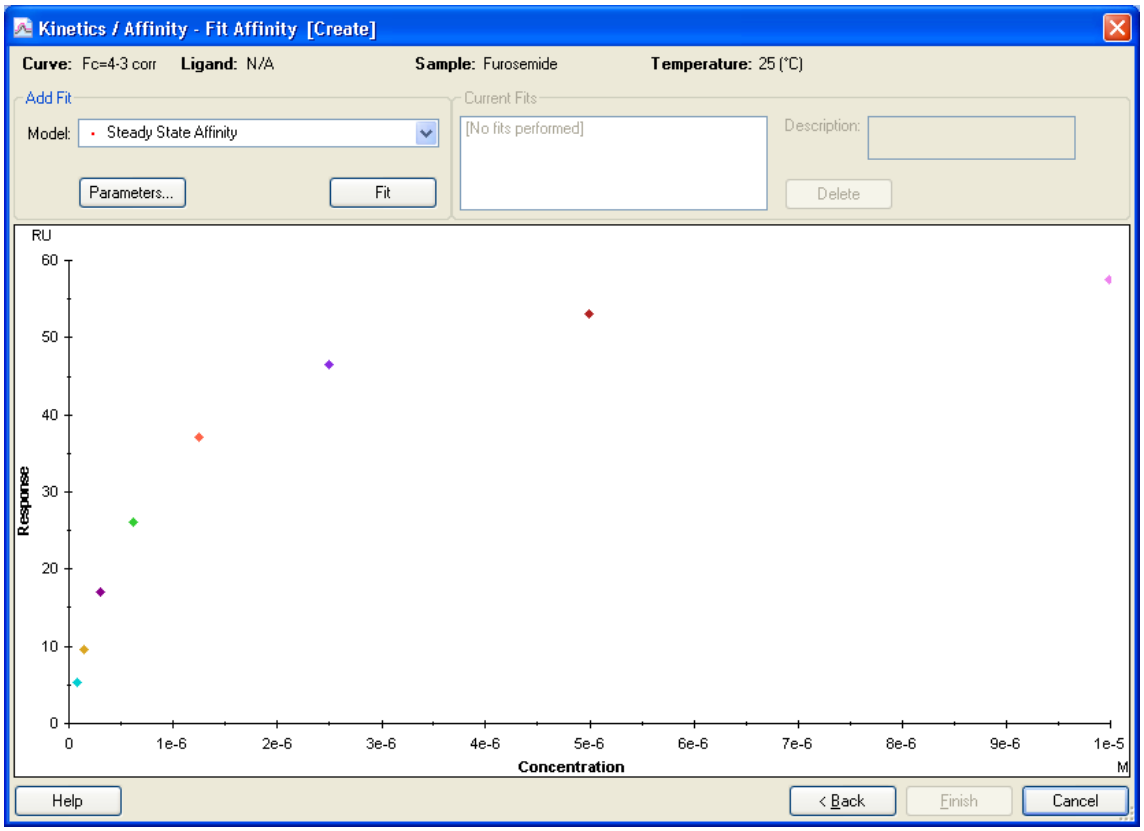
↓



アナライト添加終了直前のレスポンス（RU）を平衡値（Req 値）（RU）とし、各アナライト濃度における Req 値がプロットされる。

Next >をクリックする。

↓

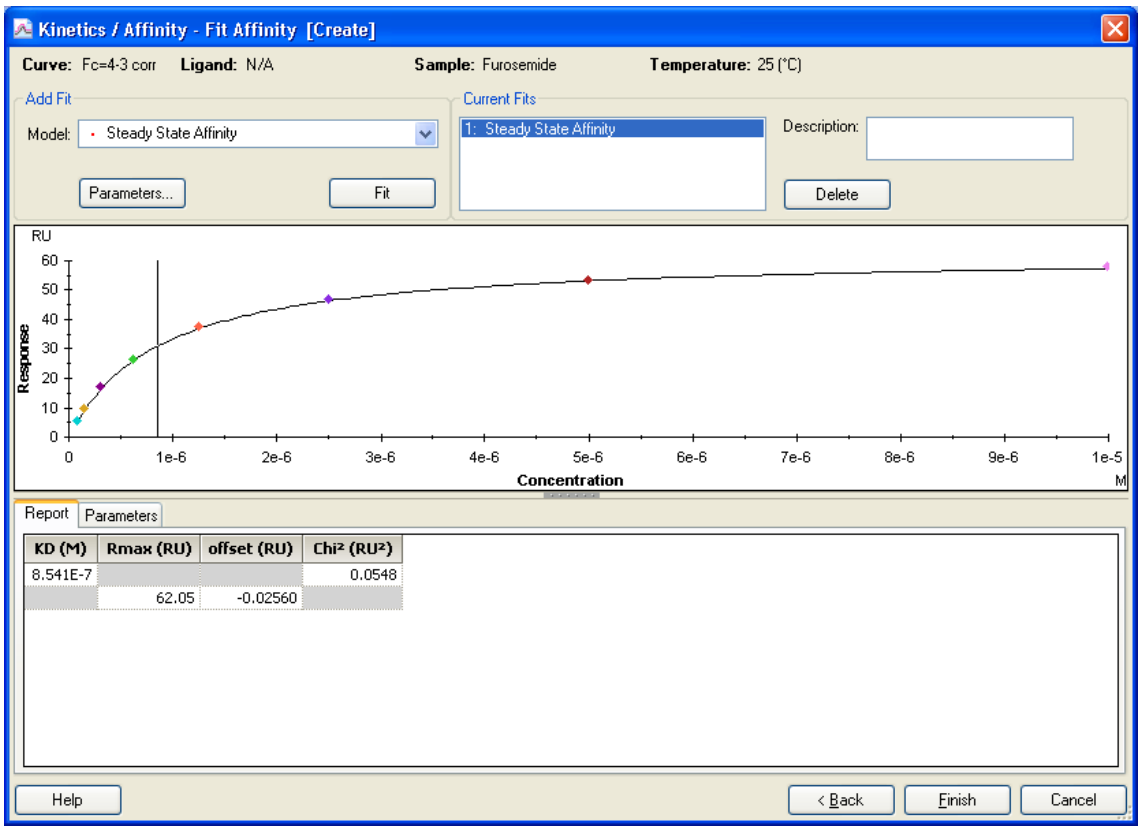


X 軸＝アナライト濃度（M）、Y 軸＝Req（RU）のグラフが表示される。

Model : Steady State Affinity が選択されている。

Fit をクリックする。

↓



終了後、**Finish** をクリックする。解析結果が表示される。グラフ上には、X 軸＝算出された KD 値（M）のラインが表示される。

K_D （M）	解離定数
R_{max}（RU）	アナライトの最大結合量
offset （RU）	溶液効果（bulk effect）
Chi^2 （RU^2）	カイ二乗

上記解析結果は、画面左端の **Evaluation Explorer** 中のフォルダに追加される。ファイル名にはサンプル名が自動的に採用される。

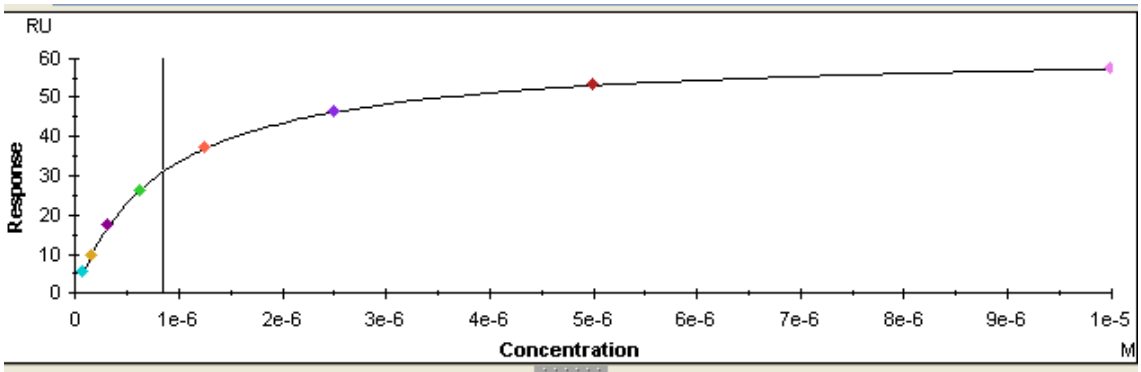
引き続き、同時に測定した別のサンプルについて解析する場合は、Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックする。

なお、“Multiple R_{max} による解析方法”については補足 5-15 を参照のこと。

補足 5-18. 平衡値解析結果の Quality Assessment

平衡値解析において、信頼性の高い解析結果を得るためには、解析結果の K_D 値がアナライトのもっとも高濃度の 1/2 以下の濃度である必要がある。つまり、アナライトの濃度範囲が低濃度領域で、R_{max} からかけ離れた平衡値範囲で測定している場合には解析結果の信頼性は低い。

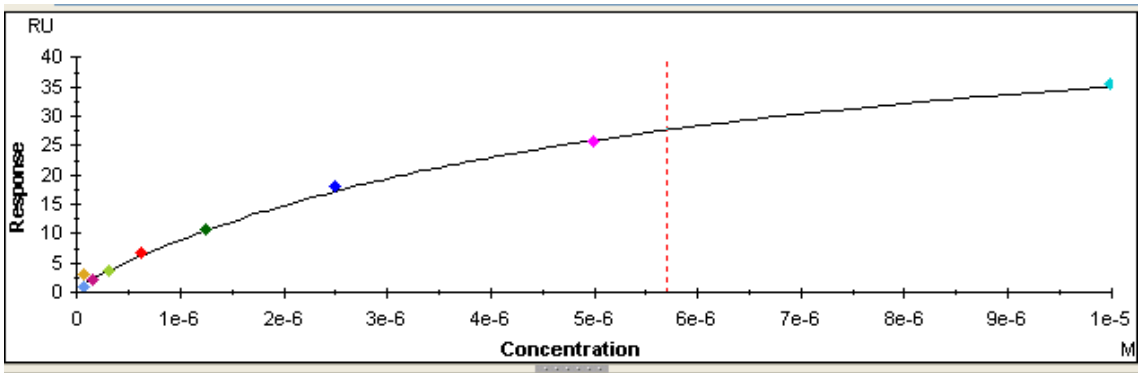
解析結果のグラフ上の、X 軸＝算出された K_D 値（M）のラインが黒色表示であれば、解析結果の信頼性は高い。



Report　Parameters

KD (M)	Rmax (RU)	offset (RU)	Chi² (RU²)
8.541E-7			0.0548
	62.05	-0.02560	

以下のように赤色の破線の場合には、濃度範囲を変更して、再度、測定および解析を実施する。



Report　Parameters

KD (M)	Rmax (RU)	offset (RU)	Chi² (RU²)
5.701E-6			0.524
	53.56	0.9490	

5-2. 反応速度定数・解離定数の算出　シングルサイクル法

マルチサイクル法とシングルサイクル法

54 ページ参照。

アフィニティーとカイネティクス

54 ページ参照。

解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a、k_d）の算出方法

55 ページ参照。

至適アナライト濃度

良好な結果を得るためには、予想される解離定数（K_D）値の 1/10～10 倍の濃度範囲で 5 濃度測定する。解離定数値が不明な場合には、1nM～1μM の範囲で、5 倍希釈系列の 5 濃度のアナライトで測定および解析をおこない、算出された暫定的な K_D 値から至適濃度範囲を求めると良い。その場合、再生ができるのであれば、リガンドを再生して、至適アナライト濃度で再測定をおこなう。再生ができないのであれば、リガンドを新しいフローセルに固定化し、至適アナライト濃度で再測定をおこなう。
また、濃度 0 についてもアナライトと同一条件で測定する。

至適な流速

30 μl/min 以上の高流速に設定する。

アナライト添加時間と解離時間

通常は、添加 2 分程度、解離 2 分程度で測定する。ただし、結合速度が遅く結合領域のセンサーグラムが直線的な場合には、センサーグラムのカーブが得られるよう添加時間を 5～10 分程度にする。また、解離速度が遅く、解離領域の傾きがほとんど確認できない場合には、解離時間を 10～30 分程度にする。

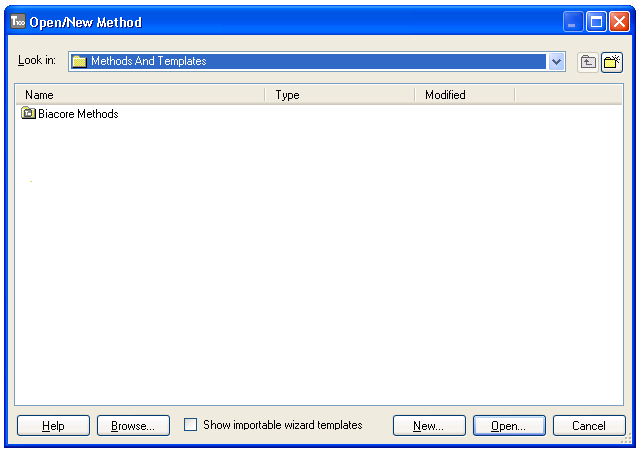
複数のアナライトの測定

通常、シングルサイクル法では、一度相互作用測定をおこなった固定化セルは繰り返し測定しない。複数アナライトがある場合や再現性確認をおこないたい場合には、その都度固定化をおこなう。ただし、リガンドが安定で、アナライトの解離速度が速い場合や、結合したアナライトが完全に解離するまでランニング緩衝液を流すプログラム設定にした場合に限り、複数のアナライト測定をおこなうこともできる。

5-2-1. プログラムの実行

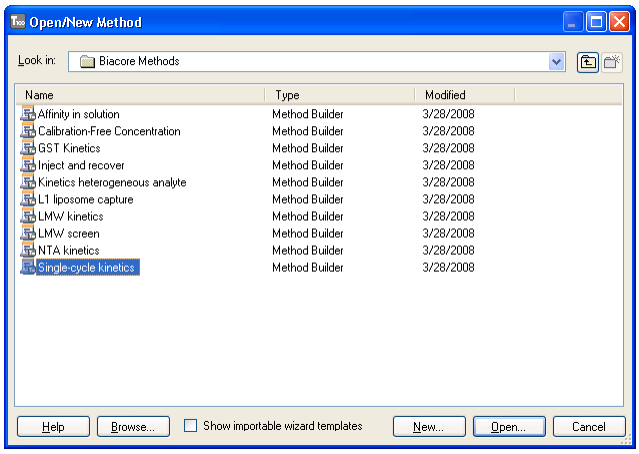
Toolbar の **Run Method** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Method...**をクリックする。

↓



Biacore Methods を選択した後、**Open...**をクリックする。

↓



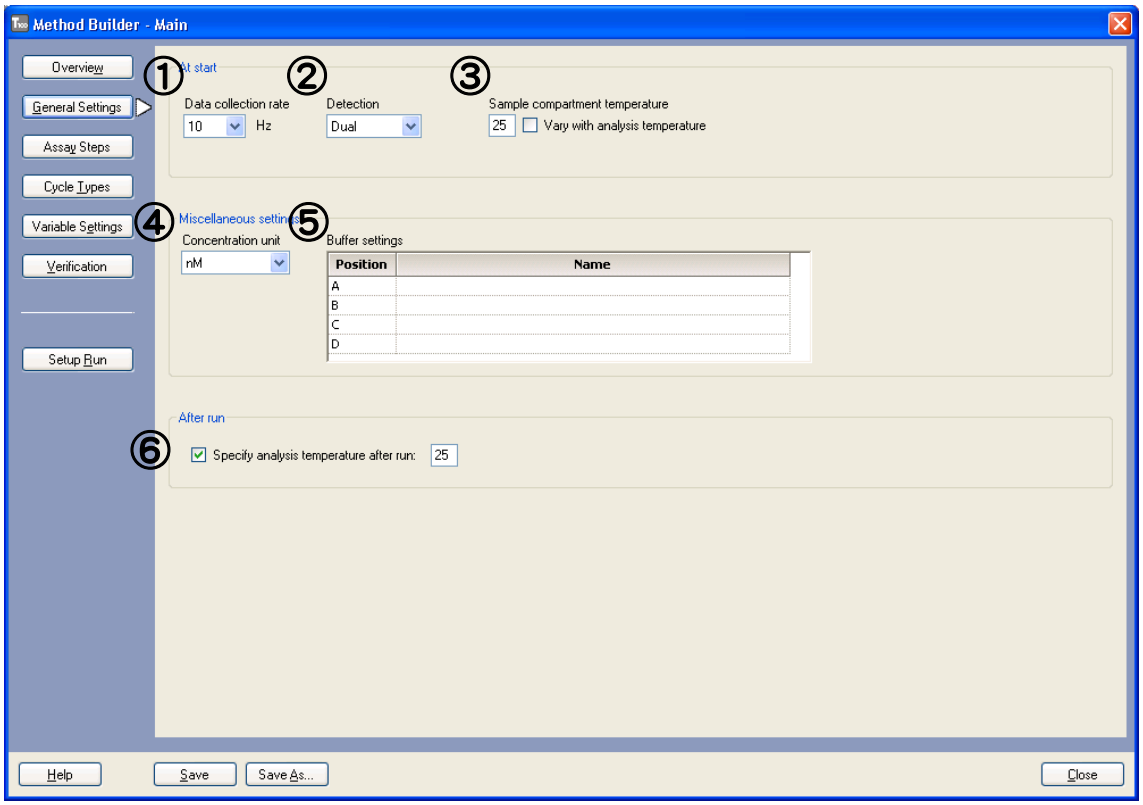
Single-cycle Kinetics を選択した後、**Open...**をクリックする。

↓

Method Builder の **Main** ダイアログが表示される。**Overview** 画面にはメソッド全体の設定項目が表示される。以下に変更項目について記載する。詳細は 6 章を参照。

↓

General Settings をクリックする。



① **Data Collection rate**

10Hz を選択。

② **Detection**

検出モードを以下の 3 つ（Single,Dual,Multi）から選択する。

Single　1、2、3、4

Dual　1,2、3,4、2-1、4-3

Multi　1,2,3,4、2-1,4-3、2-1,3-1,4-1

③ **Sample compartment temperature**

サンプルコンパートメントの温度（4～45℃）を設定。通常は、25℃。

④ **Concentration unit**

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択。

⑤ **Buffer settings**

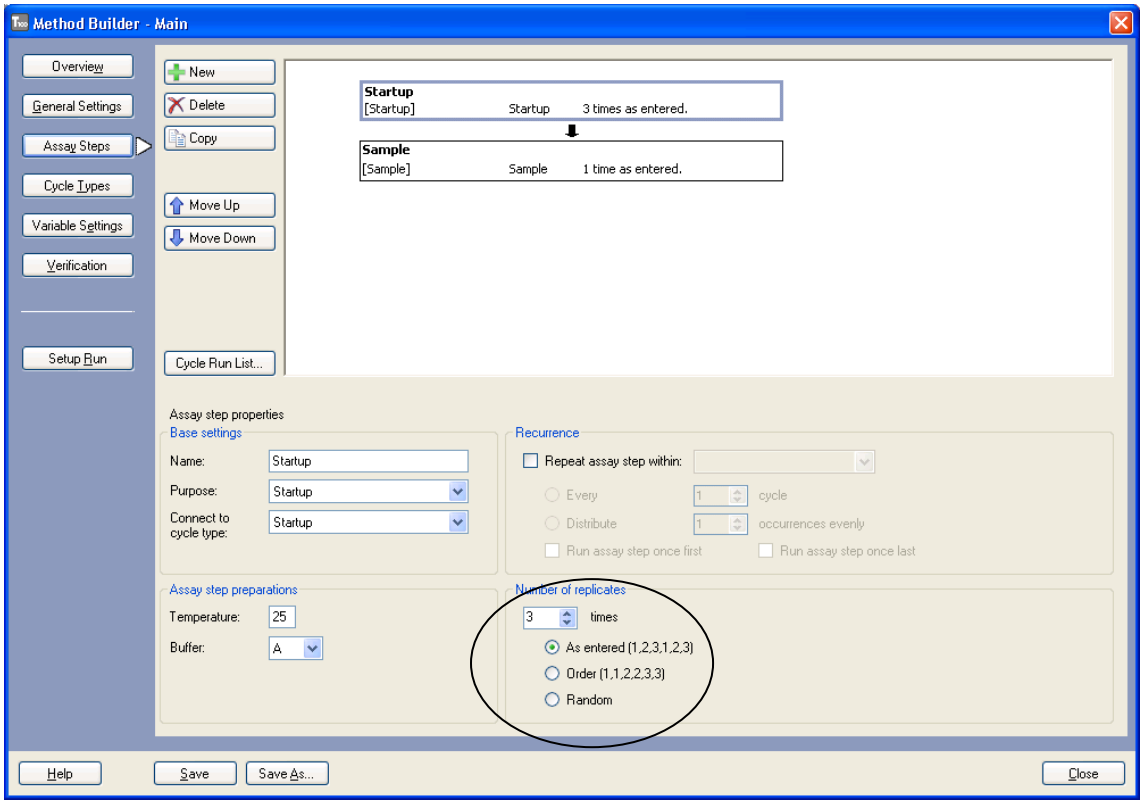
使用するランニング緩衝液名を入力。

⑥ **After run**

チェックを入れておくと、全測定が終了した後に、センサー表面の温度が指定した温度に自動変更される。

設定後、**Assay Steps** をクリックする。

↓

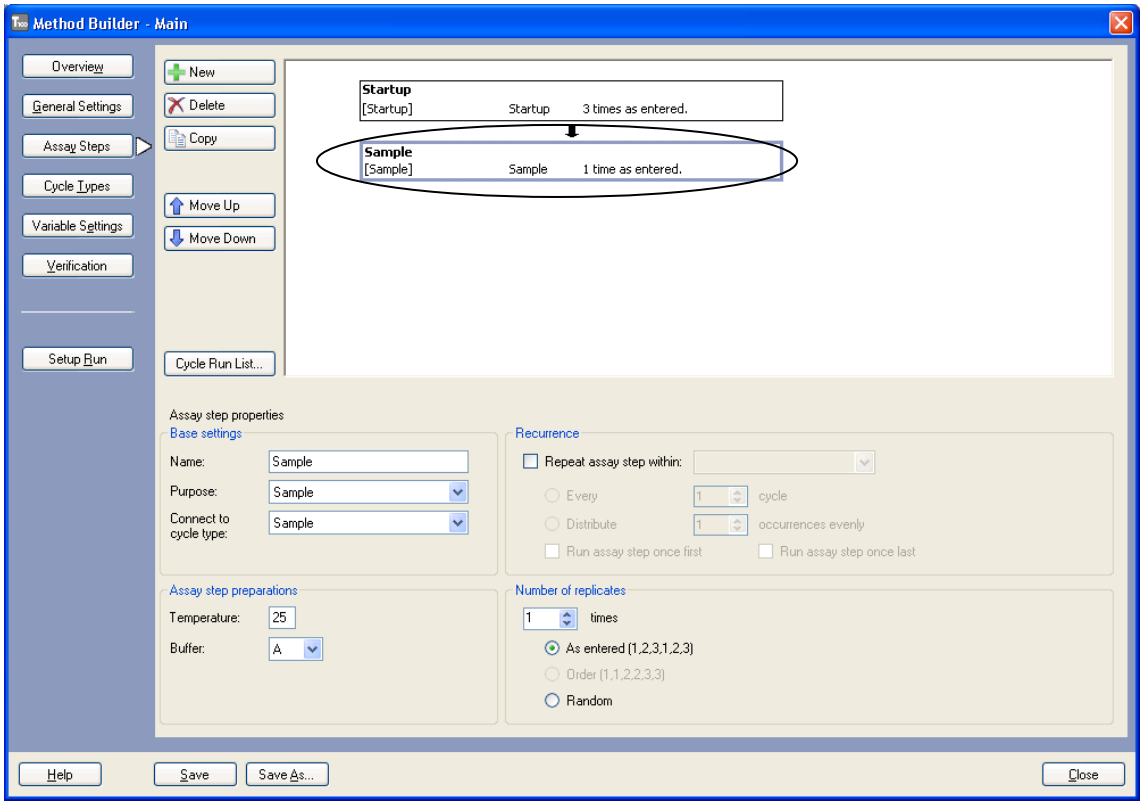


Startup を選択する。

Number of replicates

Times　ベースライン安定化のためのスタートアップの測定回数を指定する。3 回以上を推奨。

↓



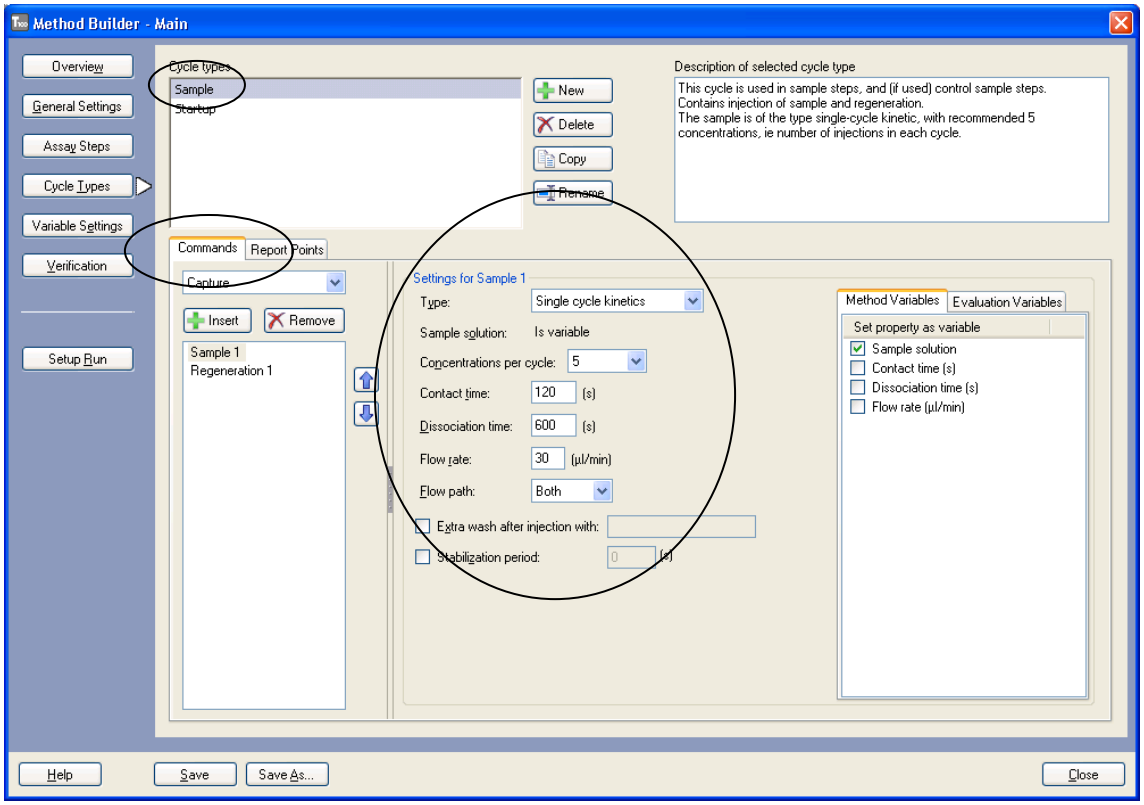
Sample を選択する。

Number of replicates

Times　　繰り返し測定回数を選択する。

↓

Cycle Types をクリックする。



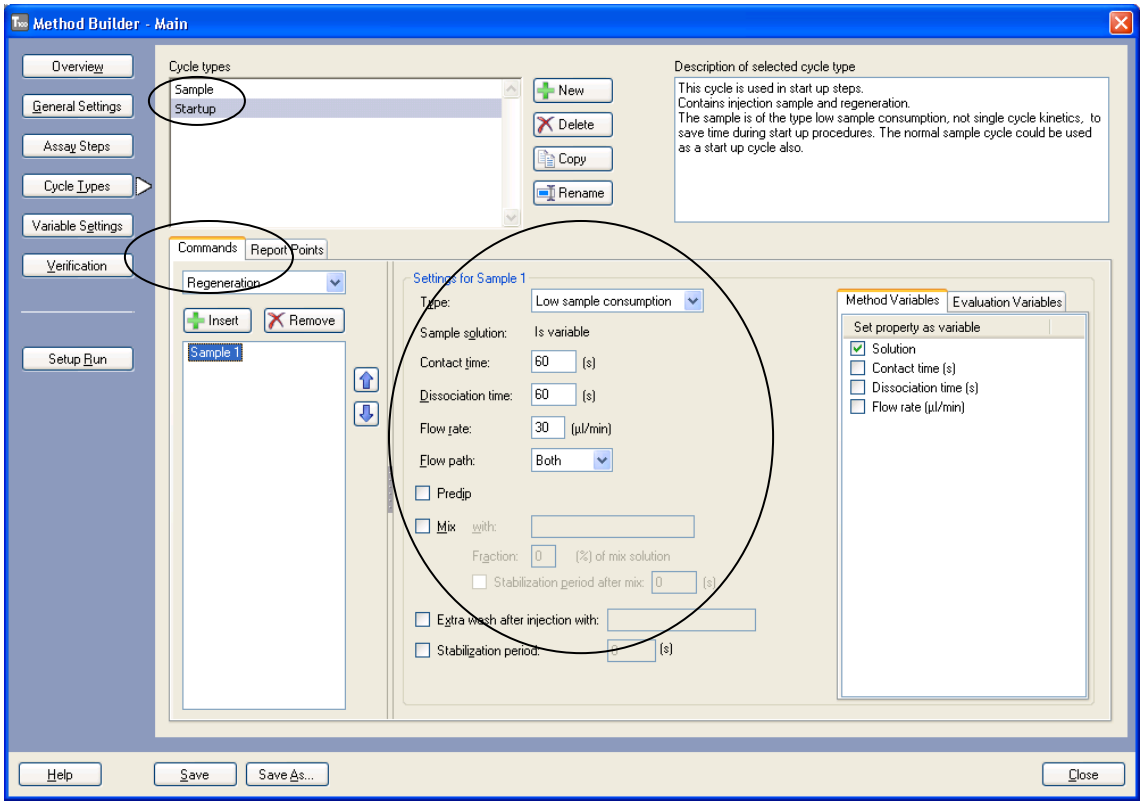
Sample をクリックする。

Type	**Single cycle kinetics** を選択する。
Concentrations per cycle	アナライトの濃度数を選択する。最大 5 濃度。
contact time	アナライト添加時間（s）。通常、2 分程度。
Dissociation time	最終添加するアナライト解離時間（s）。通常、2～10 分程度。
Flow rate	流速（µl/min）。通常、30 µl/min。
Flow path	Both または Multi を選択する。
Extra wash after injection with:	チェックを入れると指定溶液でアナライト添加後に流路内の洗浄をおこなう。センサーチップ表面には流れない。
Stabilization period	チェックを入れると指定した解離時間後に、指定した時間ベースライン安定化のための wait 時間をとることができる。

なお、再生をおこなわない場合には、**Commands** タブをクリックして、**Regeneration** を選択後、**Remove** をクリックして削除する。

↓

Startup をクリックする。アナライト測定前のスタートアップの設定をおこなう。

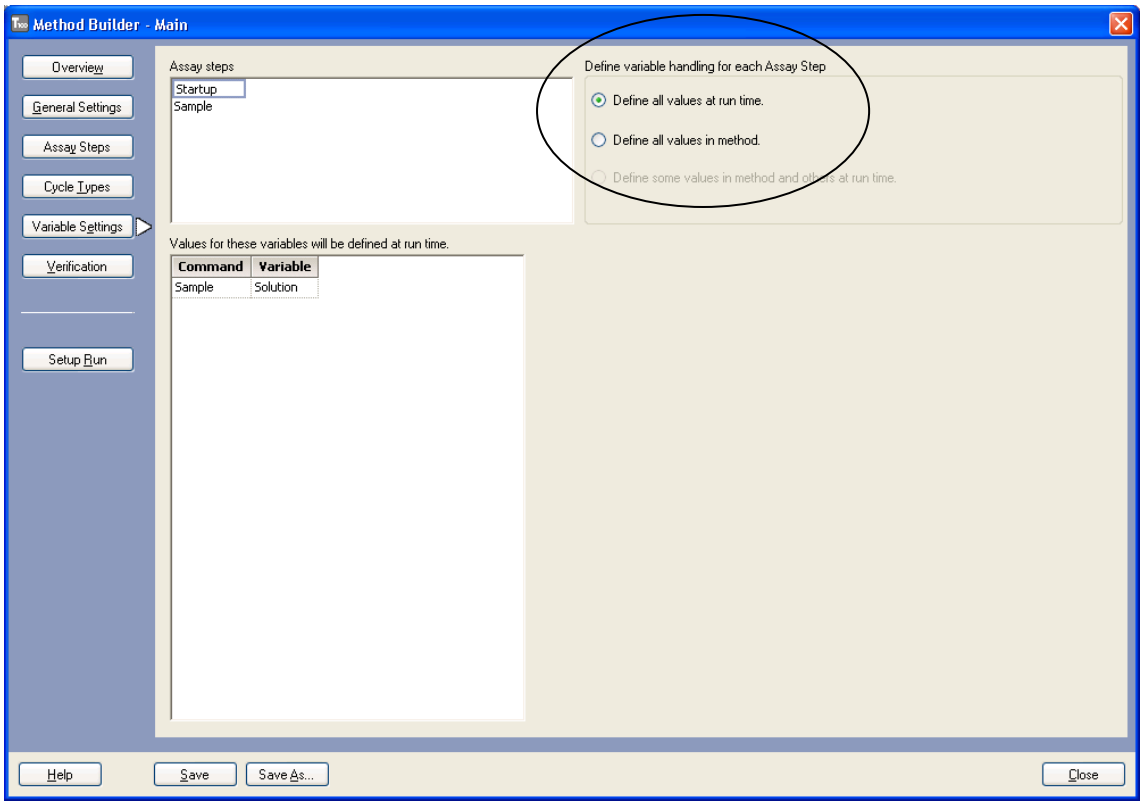


Type	**Low Sample consumption** を選択する。
contact time	添加時間（s）。通常、1 分程度。
Dissociation time	解離時間（s）。通常、1 分程度。
Flow rate	流速（µl/min）。通常、30 µl/min。
Flow path	Both または Multi を選択する。

なお、再生をおこなわない場合には、**Commands** タブをクリックして、**Regeneration** を選択後、**Remove** を選択して削除する。

↓

Variable Settings を選択する。



各ステップの変数の入力をどの時点でおこなうか、画面右上の 3 項目から選択する。

Define all values at run time

測定開始直前に入力する。

Define all values in Method

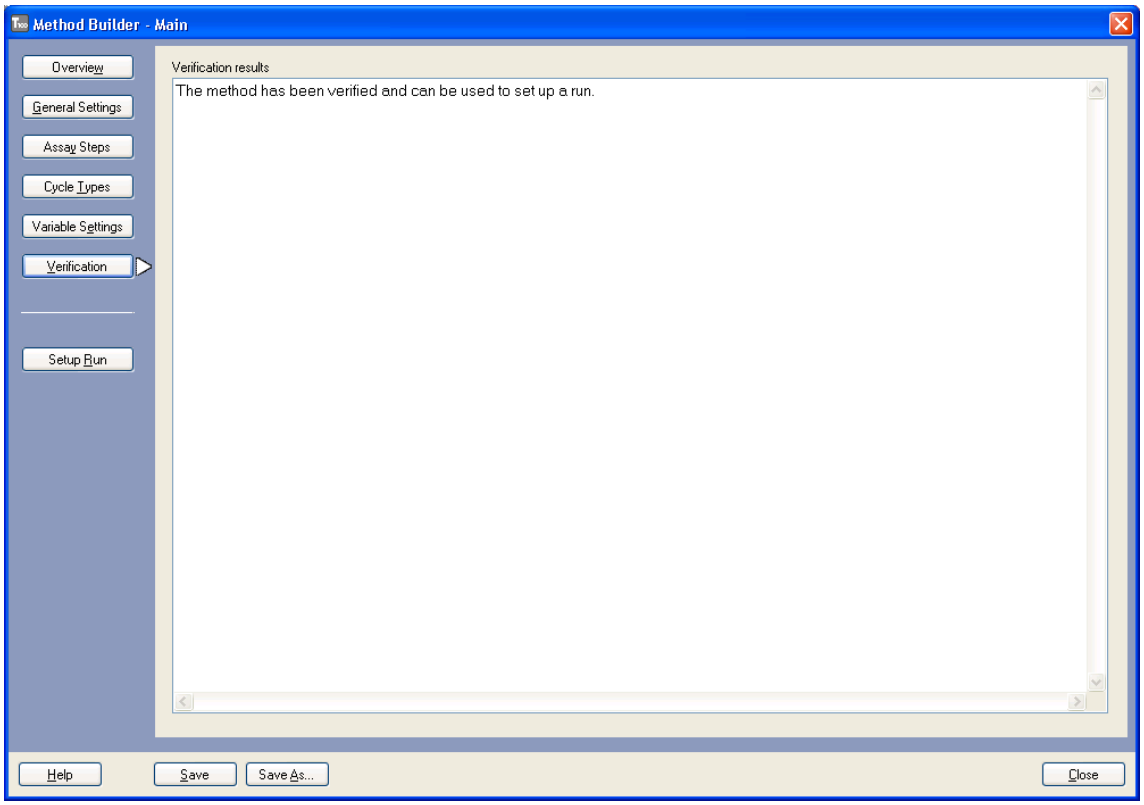
現画面上で入力する。作成したメソッドを頻繁にテンプレートとして使用し、毎回変更がない場合は、ここで入力しておくと、測定直前での情報入力が不要になるので便利である。

Define some values in Method and others at run time

幾つかの情報を現画面上で入力し、その他の情報は測定開始直前に入力する。

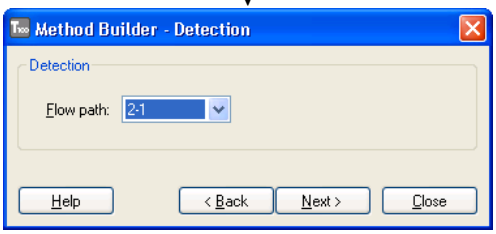
↓

Verification をクリックする。



メソッドの設定に不備が無ければ“The Method has been verified and can be used to set up a run.”と表示される。問題が有る場合は該当部分が表示されるので、指示に従って修正する。確認後、Setup Run をクリックする。

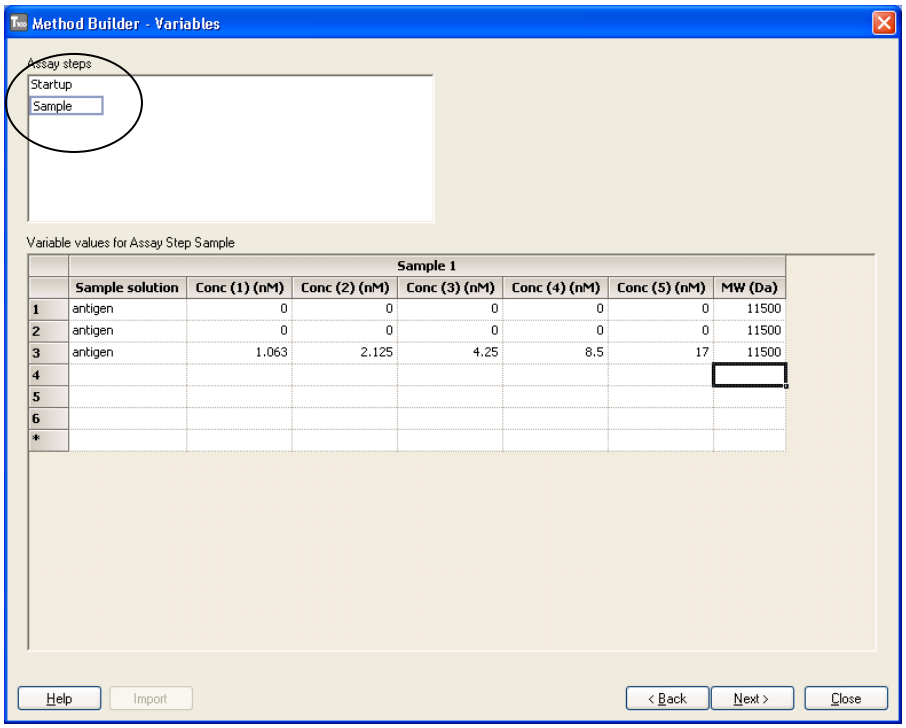
↓



適切な Flow path を選択し、Next >をクリックする。

↓

Startup、**Sample** をそれぞれクリックし、テーブルにサンプル情報を入力する。



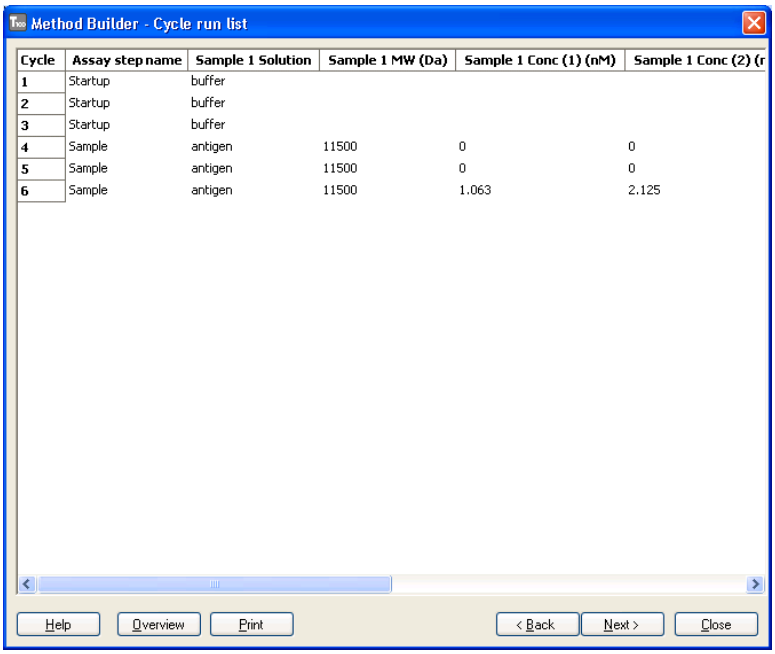
Sample1

Sample Solution	アナライトの名称
Conc（nM）	アナライト濃度 Conc （1）→Conc （5）の順番で低濃度から高濃度で入力
MW（Da）	アナライトの分子量

なお、サンプル測定前にアナライトゼロ濃度のサイクルを 2 回以上実施する。

入力後、**Next >**をクリックする。

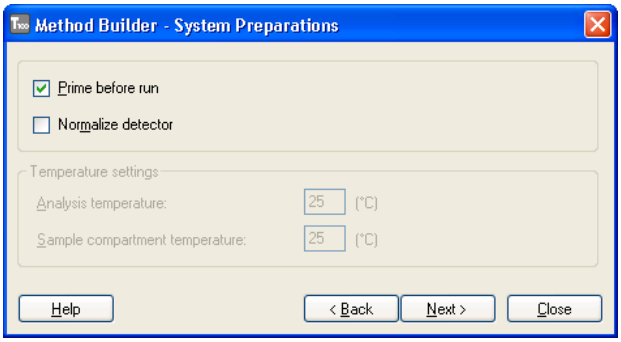
↓



測定サイクルリストが表示される。

Next >をクリックする。

↓



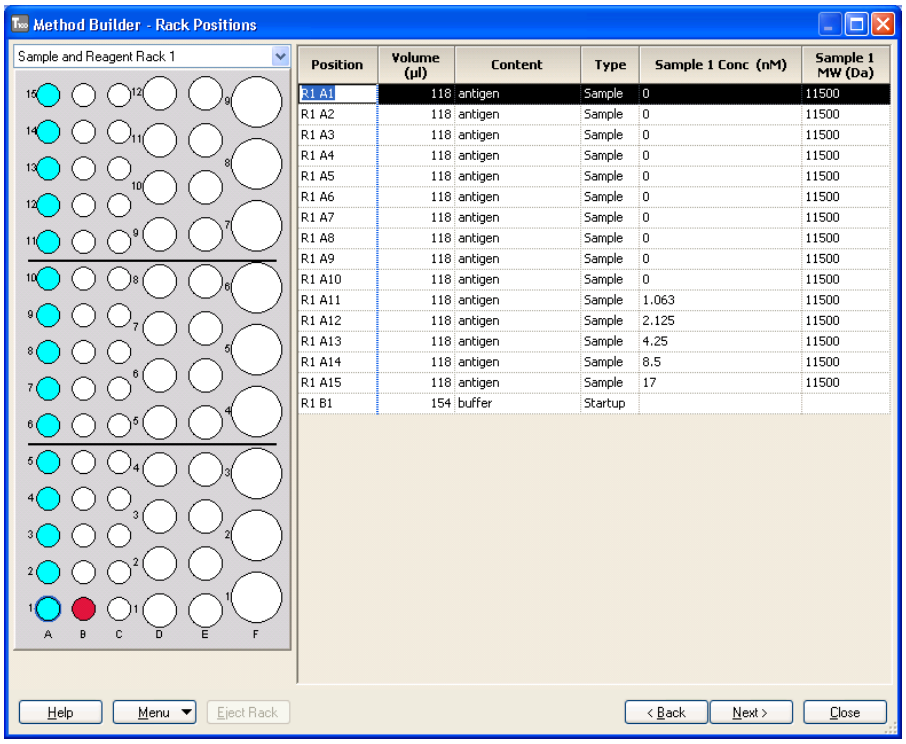
測定を始める前に、**Prime** および **Normalize** をおこなう場合にはチェックを入れる。

Temperature settings

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



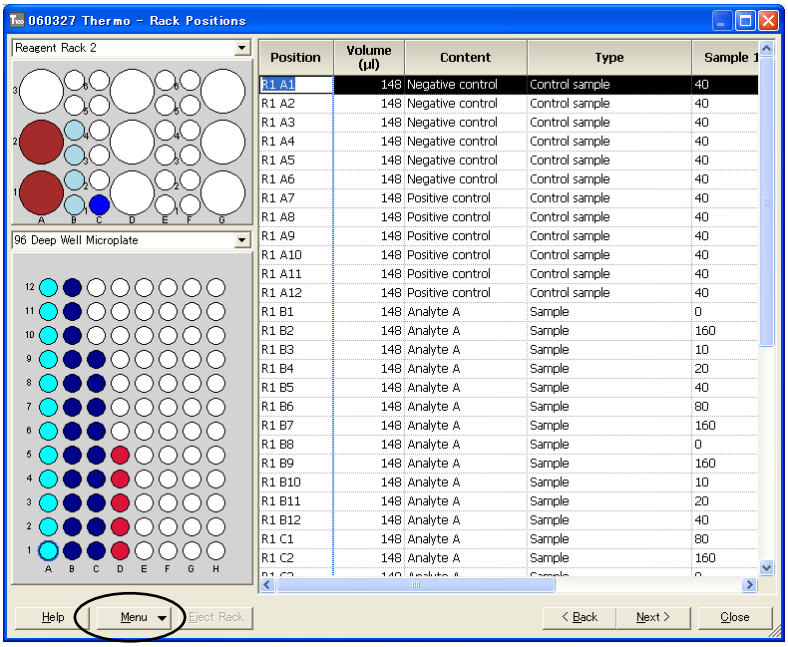
右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-19. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...** を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

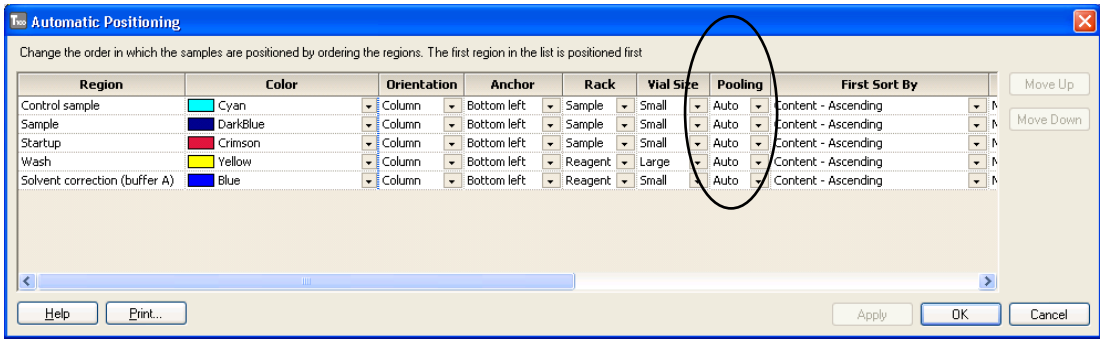
補足 5-20. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu から Automatic Positioning...を選ぶ。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定をおこなうことができる。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっている。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックする。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

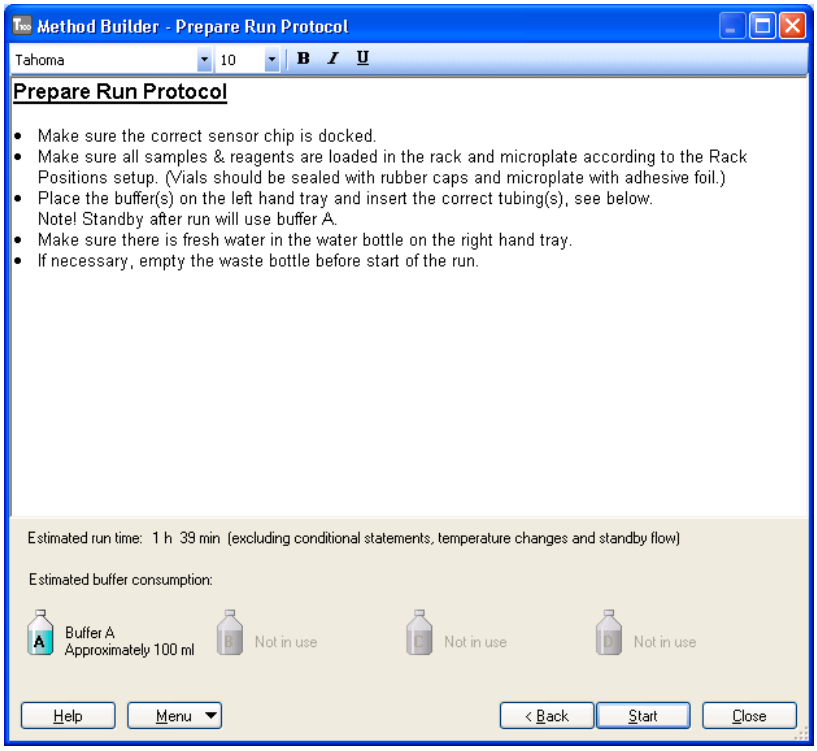
↓

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。**Eject Rack Tray** ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックする。

↓

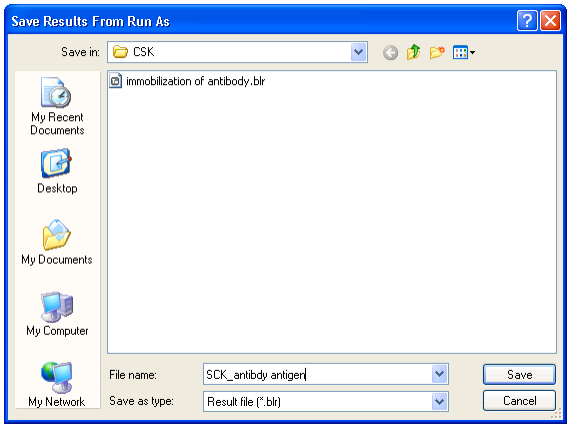

Method Builder - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 1 h 39 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Buffer A
Approximately 100 ml
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示される。
Start をクリックする。

↓

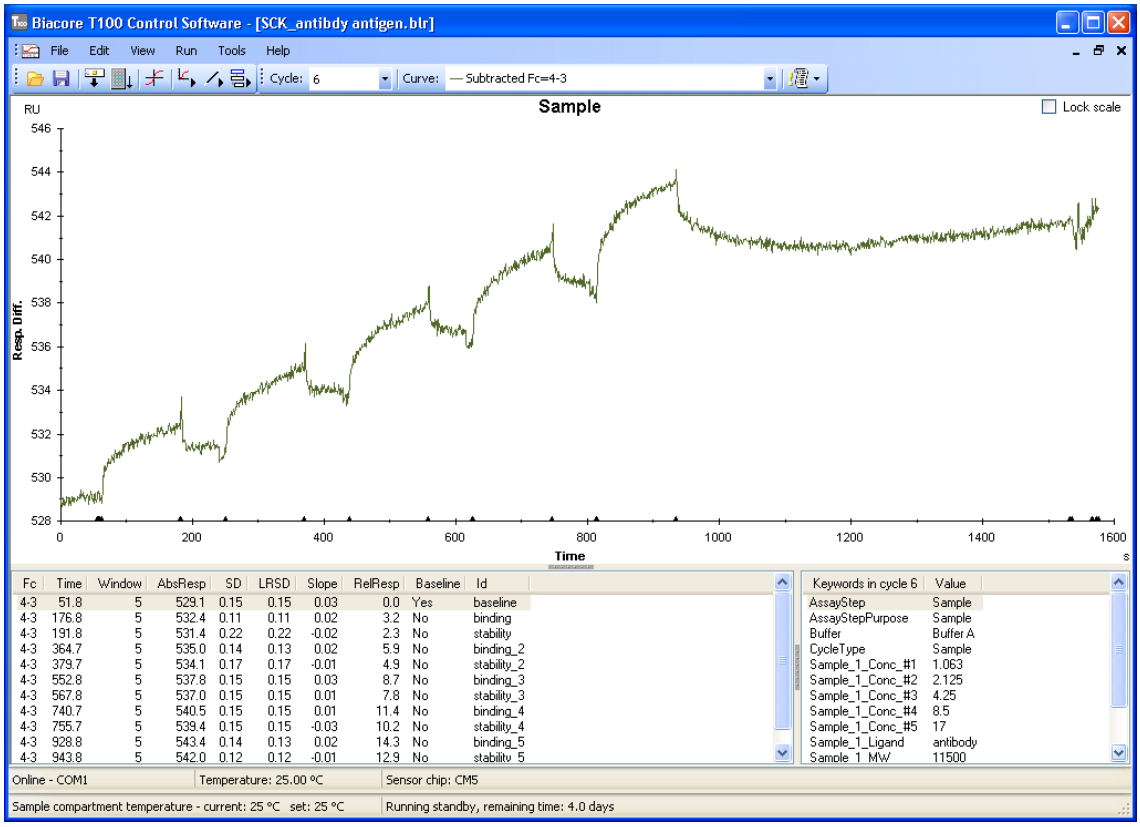
設定したメソッドをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓


Biacore T100 Control Software - [SCK_antibdy antigen.blr]
File Edit View Run Tools Help
Cycle: 6
Curve: Subtracted Fc=4-3
Sample
Lock scale
RU
Resp. Diff.
Time
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
4-3 51.8 5 529.1 0.15 0.15 0.03 0.0 Yes baseline
4-3 176.8 5 532.4 0.11 0.11 0.02 3.2 No binding
4-3 191.8 5 531.4 0.22 0.22 -0.02 2.3 No stability
4-3 364.7 5 535.0 0.14 0.13 0.02 5.9 No binding_2
4-3 379.7 5 534.1 0.17 0.17 -0.01 4.9 No stability_2
4-3 552.8 5 537.8 0.15 0.15 0.03 8.7 No binding_3
4-3 567.8 5 537.0 0.15 0.15 0.01 7.8 No stability_3
4-3 740.7 5 540.5 0.15 0.15 0.01 11.4 No binding_4
4-3 755.7 5 539.4 0.15 0.15 -0.03 10.2 No stability_4
4-3 928.8 5 543.4 0.14 0.13 0.02 14.3 No binding_5
4-3 943.8 5 542.0 0.12 0.12 -0.01 12.9 No stability_5
Keywords in cycle 6 Value
AssayStep Sample
AssayStepPurpose Sample
Buffer Buffer A
CycleType Sample
Sample_1_Conc_#1 1.063
Sample_1_Conc_#2 2.125
Sample_1_Conc_#3 4.25
Sample_1_Conc_#4 8.5
Sample_1_Conc_#5 17
Sample_1_Ligand antibody
Sample_1_MW 11500
Online - COM1
Temperature: 25.00 °C
Sensor chip: CM5
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C
Running standby, remaining time: 4.0 days

↓

終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

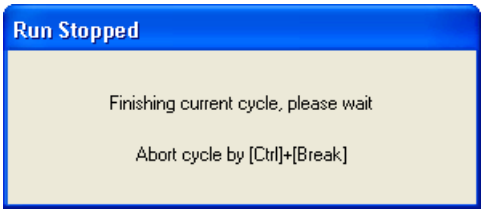
測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示される。

補足 5-21. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。

ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

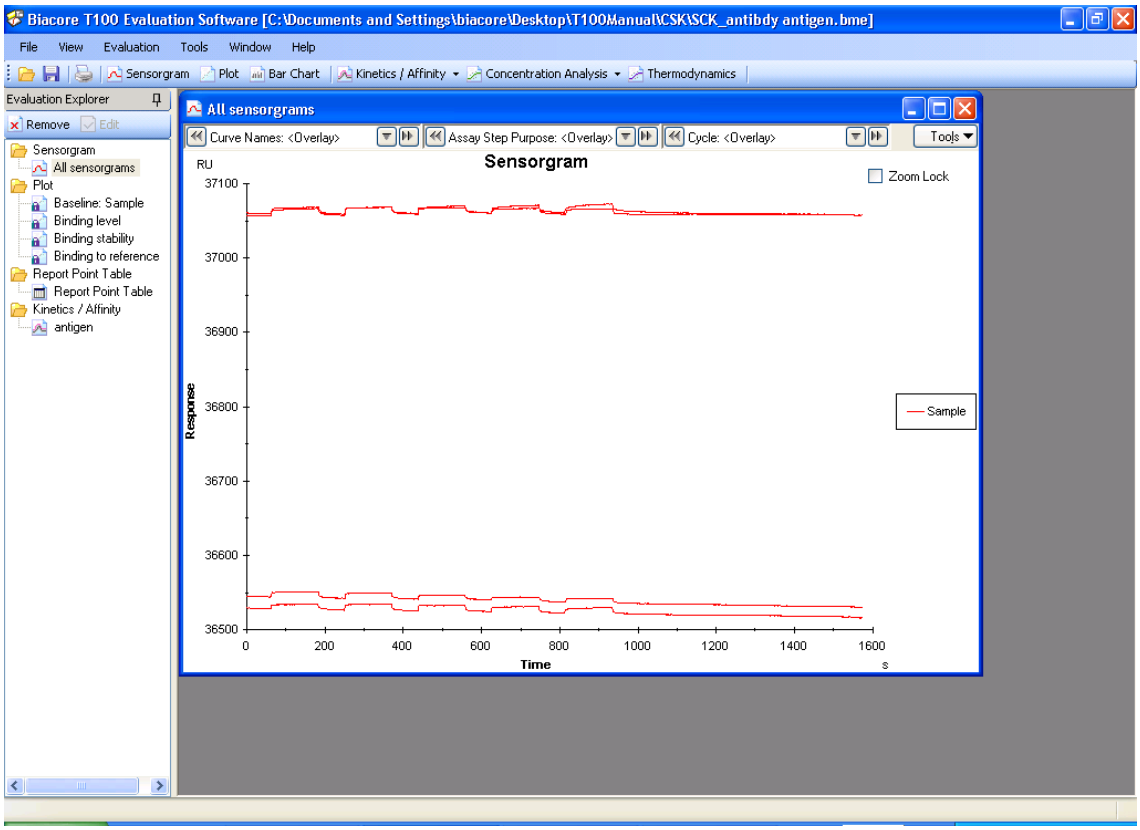
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

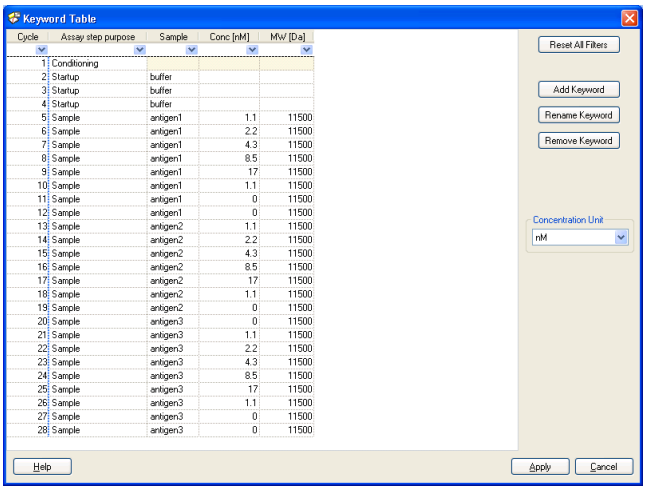
5-2-2. カーブフィッティングによる解析

メソッドを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、自動保存された取得データが開かれる。

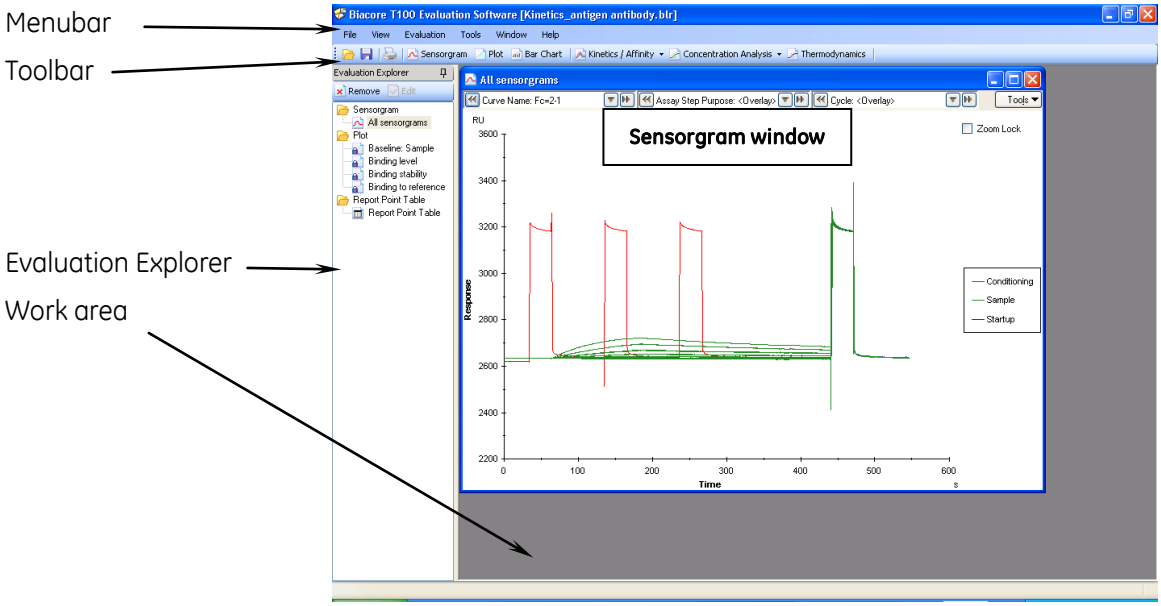


補足 5-22. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table...**で変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。



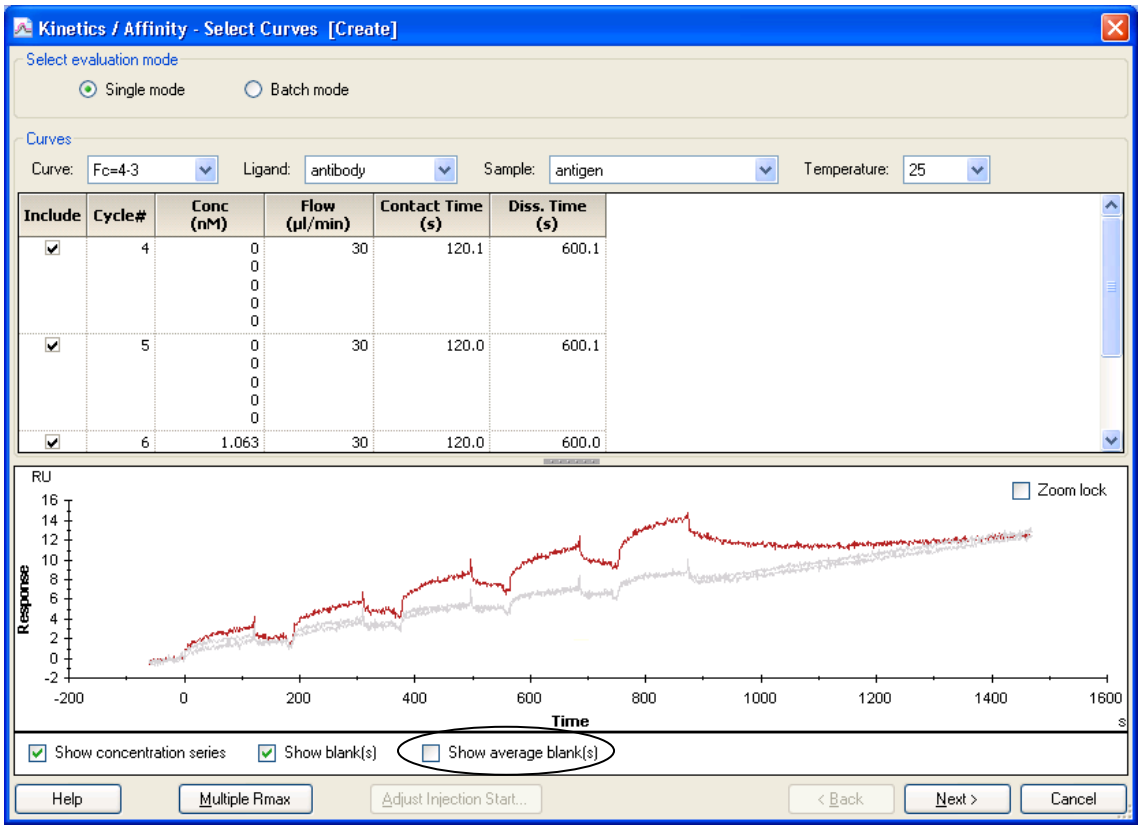
補足 5-23. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Kinetics / Affinity をクリック後、 Surface bound をクリックする。

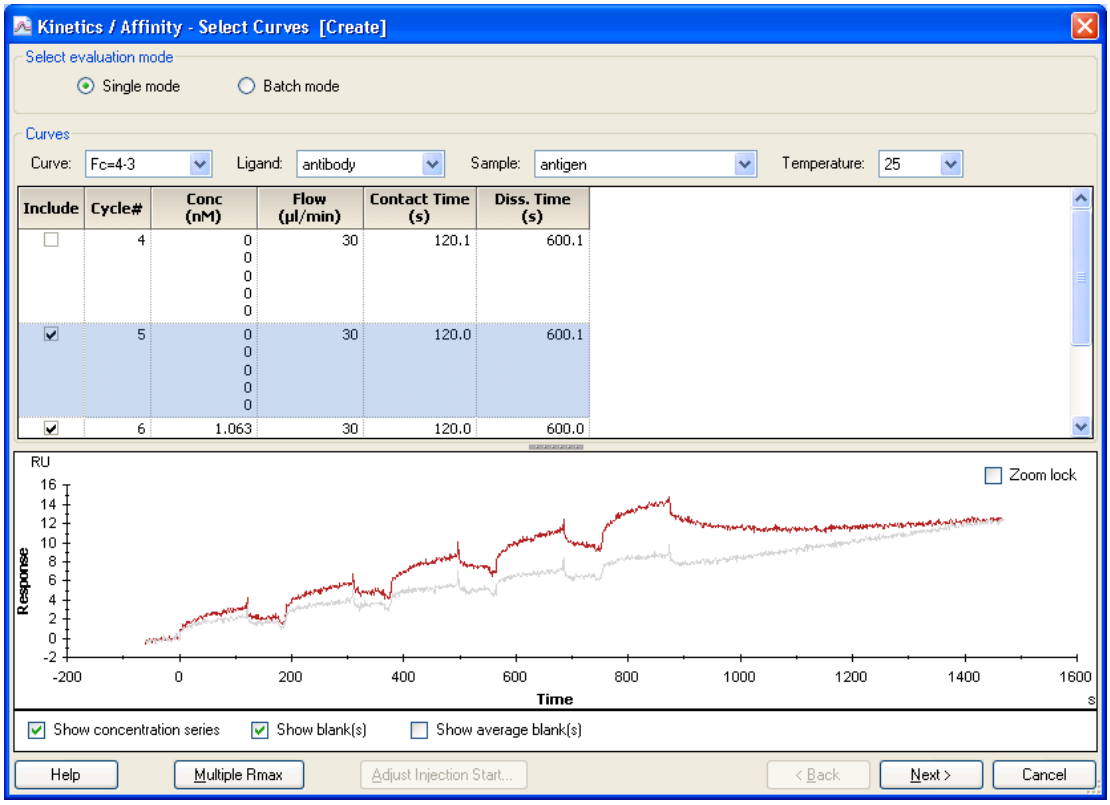
↓



同一サンプル名のセンサーグラムが重ね書き表示される。
複数のサンプルについて同時測定している場合は、Sample:右側の をクリックすると、別のサンプルデータに移行できる。

ゼロ濃度のブランクサイクルを複数回測定している場合、センサーグラム下の **Show average blank（s）**にチェックを入れると、平均したセンサーグラムが表示される。

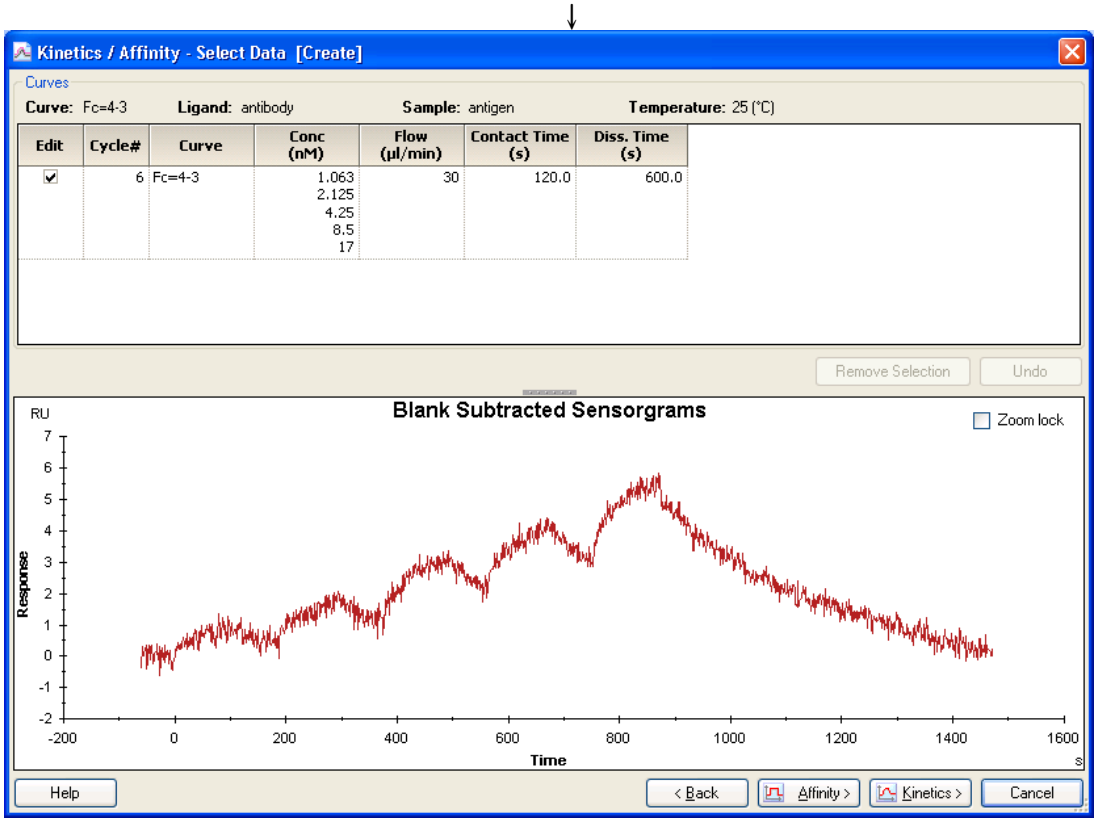
エアーの混入などの理由で、解析データから削除したいセンサーグラムがある場合は、そのセンサーグラムについて、テーブル中の Include カラムのチェックを外す。



自動的にテーブル下のチャートから、チェックを外したセンサーグラムは消える。

Next >をクリックする。

↓

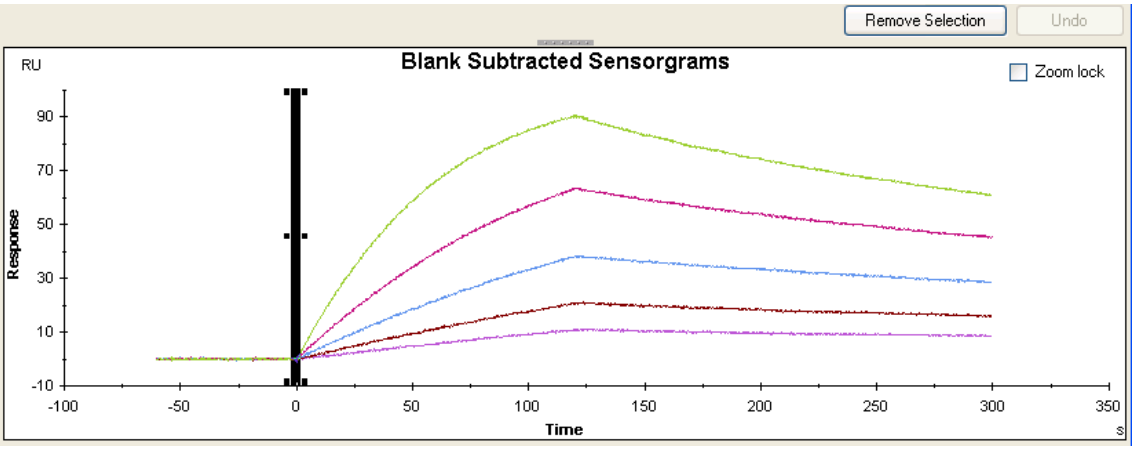


濃度 0 のセンサーグラムが、ブランクとして、全センサーグラムから差し引かれる。
添加開始・終了点のスパイク状のノイズを削除する。補足 5-24 参照。
Kinetics >をクリックする。

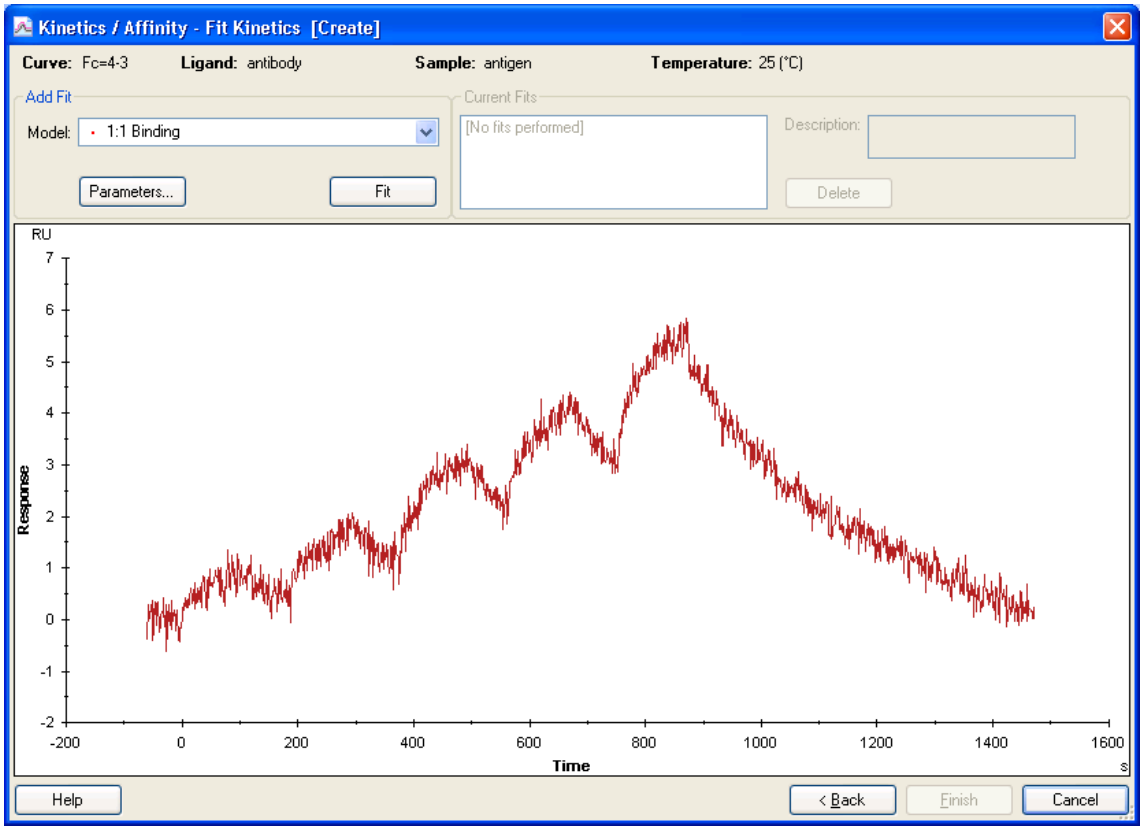
↓

補足 5-24. センサーグラムの部分的削除

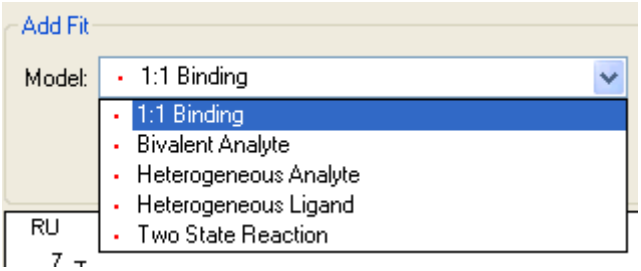
エアーの混入や添加開始・終了点のノイズなど、解析データの中から一部削除したい領域がある場合には、マウスの右ボタンをドラッグし該当の領域を拡大したのち、マウスの左ボタンをドラッグして削除する領域を選択する。拡大図を解除する場合は、センサーグラムを含まない余白をダブルクリックすると、一つ前の縮小画面に戻る。



領域を選択すると、グラフの右上の **Remove Selection** ボタンがアクティブになる。ボタンをクリックすると選択部位が削除される。



Model:に、フィッティングに採用する反応モデル式を選択する。▾をクリックすると、すべての反応モデルが表示される。反応モデルが不明な場合は、1:1 Binding を選択する。



選択後、**Fit** をクリックする。

補足 5-25. 反応モデル

リガンドを B、アナライトを A とする。

1:1 Binding　　**A + B ⇔ AB**

リガンドとアナライトが 1 分子同士で結合するもっとも単純な反応モデル。

Bivalent Analyte　　**A + B ⇔ AB , AB + B ⇔ AB2**

アナライトが 2 価もしくはホモ 2 量体の反応モデル。AB 複合体形成後、リガンド B が 2 次的に結合する反応。

Heterogeneous Analyte　　**A1 + B ⇔ A1B , A2 + B ⇔ A2B**

競合反応。リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合する反応。

Heterogeneous Ligand　　**A + B1 ⇔ AB1 , A + B2 ⇔ AB2**

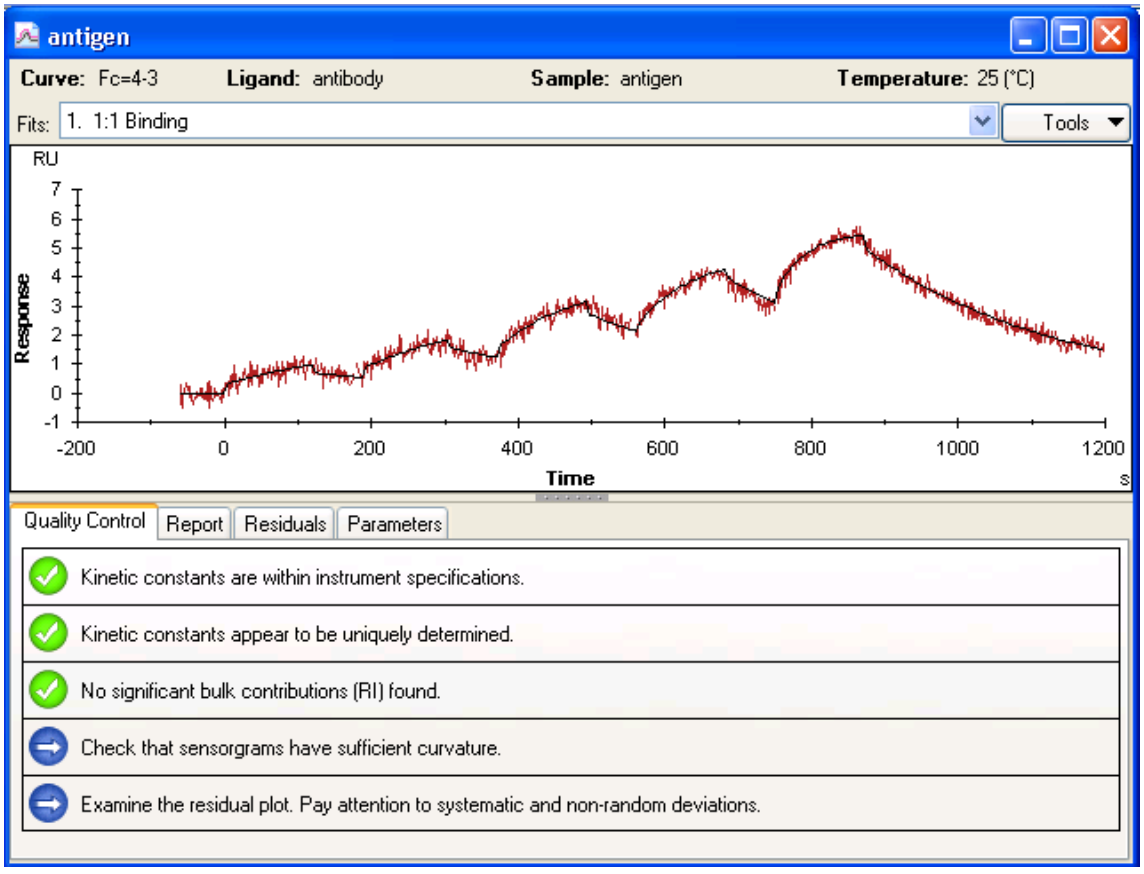
アナライトに対して親和性の異なる 2 つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並行して結合する反応モデル。

Two state Reaction　　**A + B ⇔ AB ⇔ AB***

リガンドとアナライトの 1 分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメーション変化を起こす反応モデル。

↓

解析結果が表示される。



黒色のセンサーグラムは、フィッティングにより得られたフィッティングカーブである。1:1 binding で解析をおこなった場合には、**Quality Control** テーブルが表示され、解析結果の評価が表示される。補足 5-26 参照。

補足 5-26. 解析結果の Quality Control

5 項目の品質評価結果が、ステータスマークで表示される。

ステータスマーク

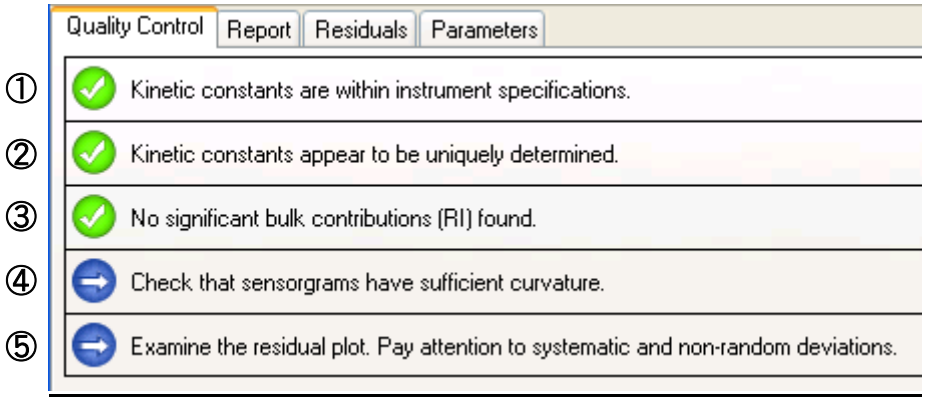
クオリティーアセスメントにパスしている。

クオリティーアセスメントの許容限界に近い。

クオリティーアセスメントにパスしていない。

ニュートラルまたは各自で確認が必要。

品質評価基準



①速度定数はシステムのスペック範囲内か？

スペック範囲　k_a = 10^3～10^7 (1/Ms)、k_d = 10^{-5}～0.5 (1/s)

②各パラメータは独立して算出されているか？

k_a、k_d および R_{max} について解析結果に与える、パラメータ間の相関性を確認している。マストランスポートリミテーション下で測定した結果は、k_a、k_d に相関性が見られる。

③溶液効果の値（RI）の妥当性は？

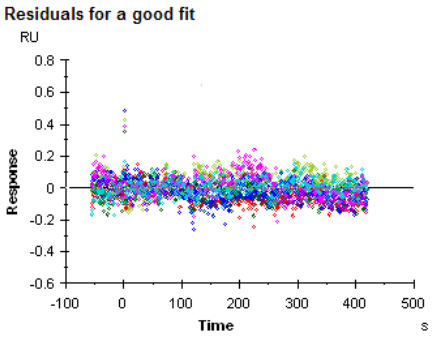
リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引いている場合には、RI は限りなくゼロとなるが、結合・解離速度が速くセンサーグラムが箱型の場合には、RI の値が大きく算出され、解析結果へ影響を与える。

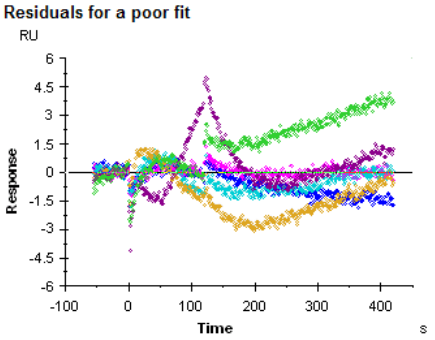
④センサーグラムはカーブを描いているか？

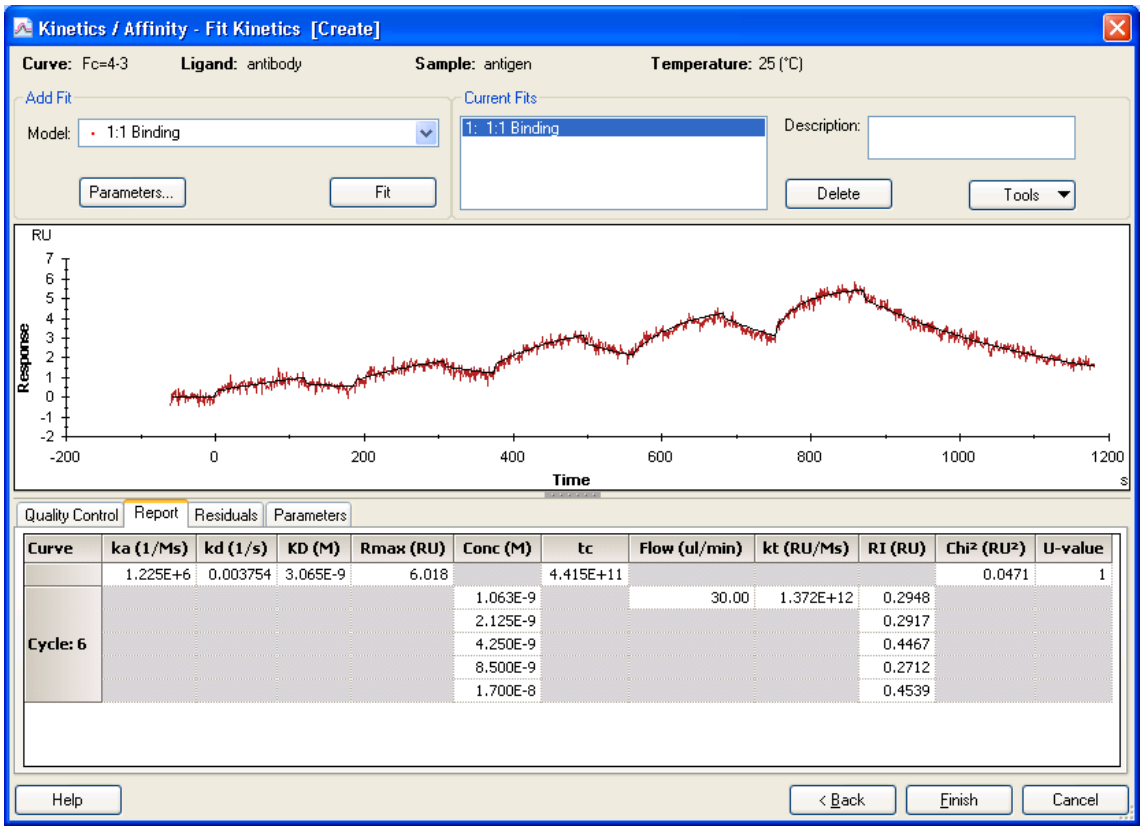
センサーグラムの結合・解離領域が直線的な場合には、良好なフィッティングをおこなうことができない。

⑤フィッティングカーブに対して測定プロットは、ランダムに分散しているか？

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認する。Y 軸のゼロ近傍で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できる。ランダムに分散していない場合には、良好なフィッティング結果ではない。







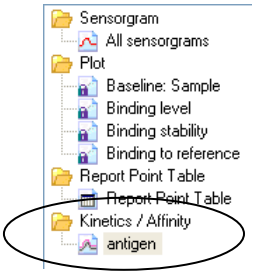
Report をクリックすると、算出された各種パラメータが表示される。

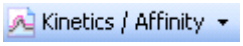
k_a （1/Ms）	結合速度定数
k_d （1/s）	解離速度定数
K_D （M）	解離定数
R_{max} （RU）	アナライトの結合最大量
RI （RU）	溶液効果（bulk effect）
Chi^2 （RU^2）	カイ二乗
U-value	U-バリュー

Finish をクリックする。

↓

上記解析結果は、画面左端の **Evaluation Explorer** 中のフォルダに追加される。ファイル名にはサンプル名が自動的に採用される。



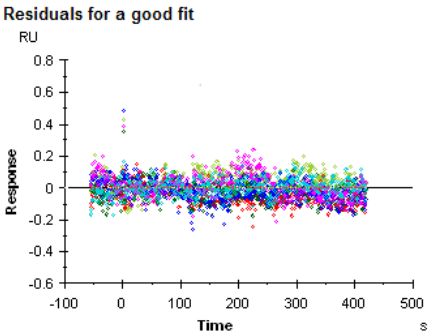
引き続き、同時に測定した別のサンプルについて解析する場合は、Toolbar の  をクリックする。

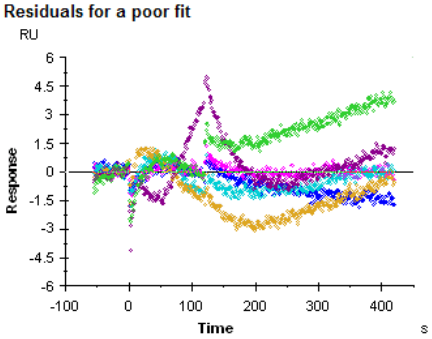
補足 5-27. フィッティング結果の評価

フィッティングが良好な場合、センサーグラムとフィッティングによって得られたフィッティングカーブがほぼ重なる。特に、センサーグラムの傾きが大きく異なる場合、フィッティングは良好ではないと判断する。また、解析結果の RI 値が 0（RU）に近いか確認する。

Residual

Residuals タブをクリックして、残差プロットを確認する。Y 軸のゼロ近傍で、ランダムにプロットが分散している場合は良好なフィッティングと判断できる。





Chi² 値

測定データとフィッティング曲線間の差を示す。良好なフィッティングでは、シグナルノイズの平均平方値に一致する。

U-value

解析値が信頼できるか否かを判断する値。15 以下であれば問題ない。
25 以上の場合には、算出された値の信頼性は低い。

SE （Standard error）

Parameters タブをクリックすると、各パラメータについて SE（標準誤差）が表示される。各パラメータの解析結果に対して、SE の値が 10%以下であれば問題ない。

フィッティングが良好ではない要因

①フィッティングに採用したモデルが異なっている
②箱型のセンサーグラムである
③経時的なリガンドの活性低下が考えられる
④アナライト濃度の調製ミスが考えられる　等

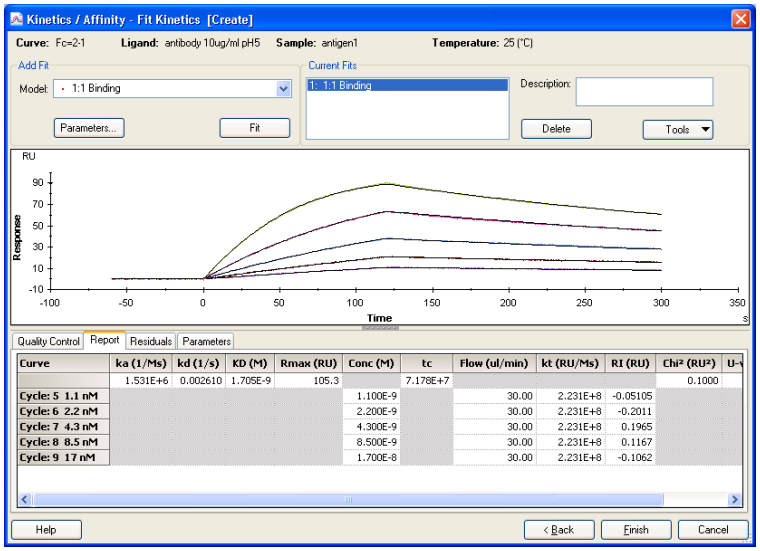
①が要因と考えられる場合は、再度妥当な反応モデルを選択し解析する。

②が要因の場合、解析結果の RI がセンサーグラムのレスポンスの大半を占める値になることがある。これは、結合解離領域の急激なレスポンスの変動を RI とみなしてしまうからである。この場合は、RI=0 （Constant） として再解析する必要がある。

複数濃度のセンサーグラムから 1 つの定数を算出する解析方法では、すべての濃度のセンサーグラムにおいて k_a, k_d, R_{max} が同一のパラメータとして算出される。しかし、上記③、④の実験状況では、各濃度のセンサーグラムにおいて、これらのパラメータが異なり、良好な解析結果が得られない。

補足 5-28. カーブフィッティングにおける再解析

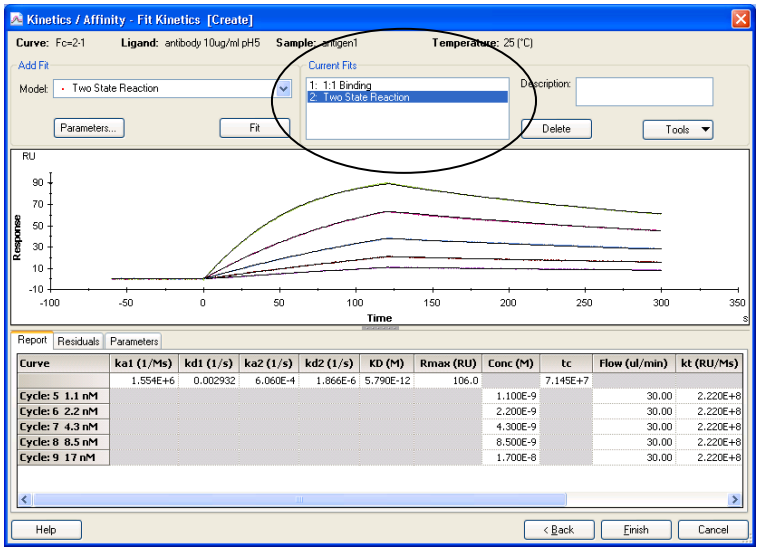
反応モデルの変更



反応モデルを変更し再解析する場合は、**Finish** をクリックせず、**Add Fit** ボックスの **Model:** 右側の▼をクリックし、新しい反応モデルを選択する。**Fit** をクリックする。

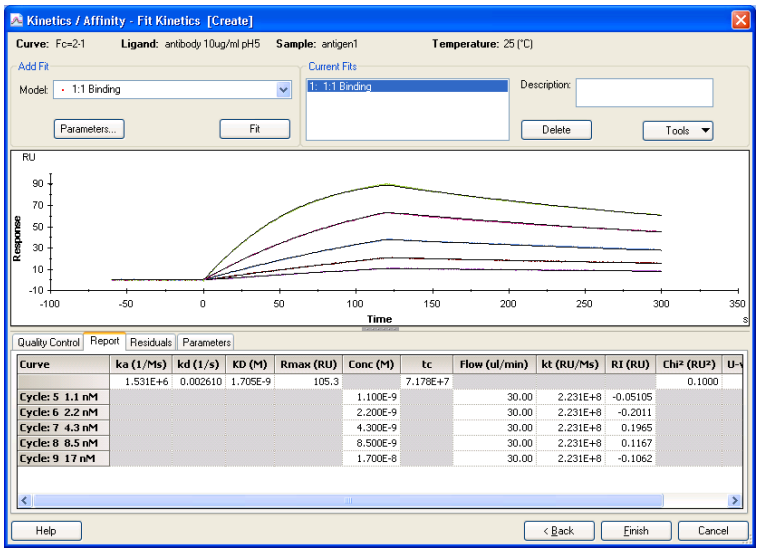
↓

新しい解析結果が表示される。



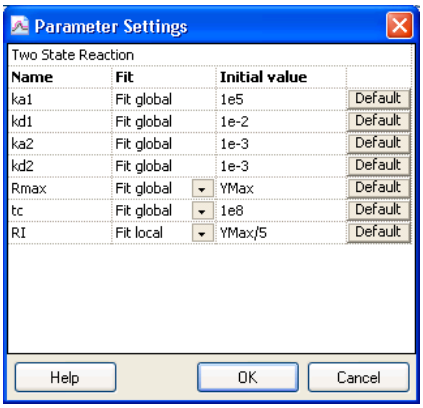
解析したすべての結果は、履歴として、**Current Fits** ボックスに残る。
前の解析結果を見る場合は、**Current Fits** ボックスの目的の反応モデルをクリックすると結果が表示される。終了後、**Finish** をクリックする。

解析パラメータの解析設定条件の変更



解析パラメータ（R_{max} ,RI）の解析設定条件を変更し再解析する場合は、**Add Fit** ボックスの **Parameters** をクリックする。

↓

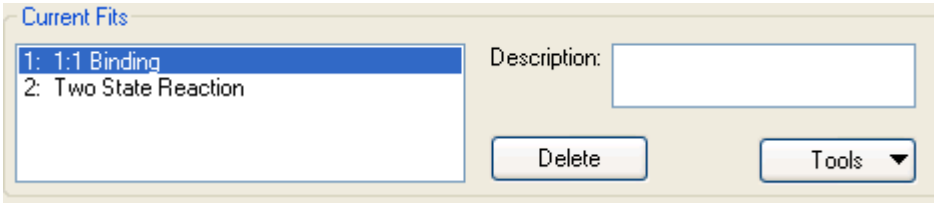


経時的なリガンドの活性低下が原因で、全センサーグラムにおいて、R_{max} を同一パラメータとみなせない場合、R_{max} の行の **Fit** カラムの▼をクリックし、**Fit local** を選択する。
箱型のセンサーグラムを解析する際に、濃度 0 のセンサーグラムを差し引いているにもかかわらず、センサーグラムの急激なレスポンスの変化を RI としてみなしてしまう場合、RI の **Fit** カラムの▼をクリックし、**Constant** を選択する。Initial value は自動的に 0 が入力される。

Parameter Setting ダイアログ中の **OK** をクリックすると、条件が適用される。
引き続き、**Fit** をクリックすると解析結果が表示される。

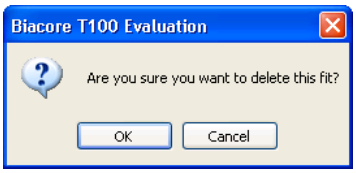
補足 5-29. 解析履歴からの結果の消去

解析結果を履歴から消去する場合は、**Current Fits** ボックス中の目的のデータを選択する。



Delete をクリックする。

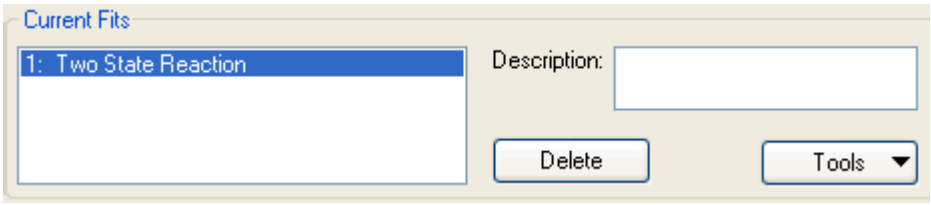
↓



確認ダイアログが表示される。

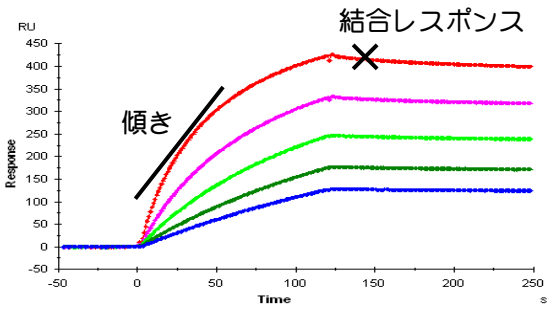
消去する場合は **OK** をクリックする。

↓



解析結果が消去される。

5-3. 濃度測定

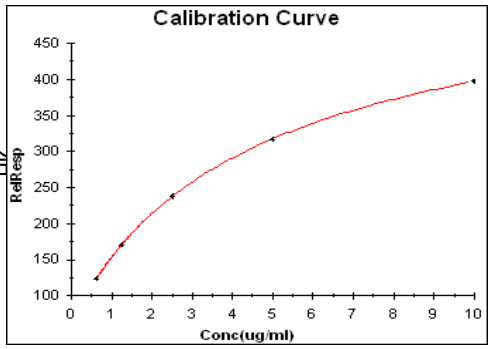


Biacore による濃度測定では、定量したい分子（A）に対して親和性を持つ分子（B）が必要となる。B を固定化したセンサーチップ表面に A を添加すると、添加した濃度に依存した結合レスポンス（RU）が得られる。数段階の濃度既知の A を添加し、その結合レスポンスを得て、検量線（RU vs C）を作成する。濃度未知の A に対しても同様に添加し、その結合レスポンスを検量線にフィッティングすることにより濃度を算出する。

また、A 添加直後のセンサーグラムの傾き（Slope）も結合レスポンス同様に、添加している A の濃度を反映した値となるため、Slope vs C の検量線からでも定量をすることができる。

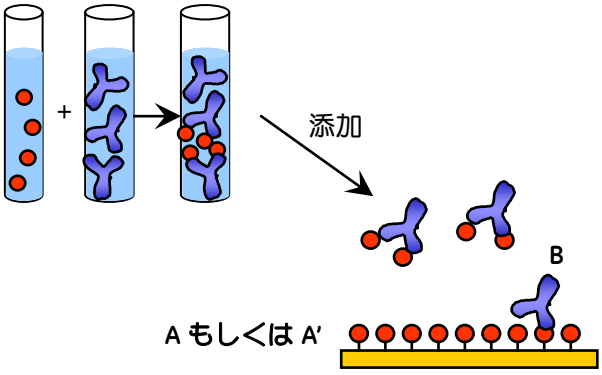
直接法と阻害法

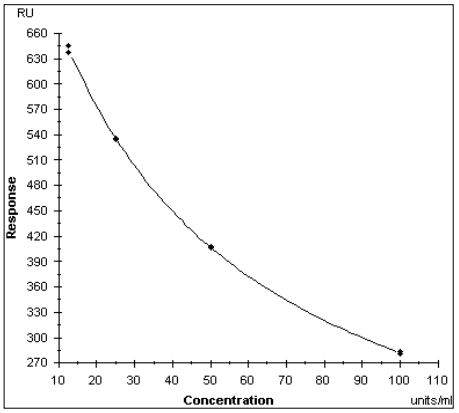
親和性を持つ分子（B）をセンサーチップ表面に固定化し、定量分子 A を添加して得られる結合レスポンスから直接 A の濃度を算出する方法を**直接法**と呼ぶ。それに対し、化合物やペプチドなど分子量が小さい分子の定量をおこなう場合 A もしくは A のアナログ（A'）をセンサーチップに固定し、定量分子 A と A に対して親和性を持つ分子 B を一定量混合した混合液を添加し、未反応の B を定量することにより、混合液中に存在する A を逆算する定量法を**阻害法**と呼ぶ。



直接法による検量線

阻害法



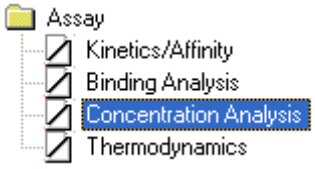


阻害法による検量線

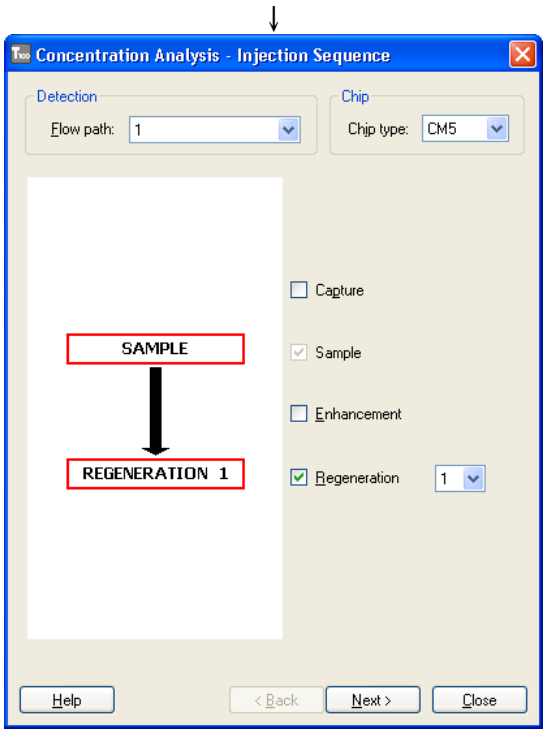
5-3-1. プログラムの実行

濃度測定では、原則としてリファレンスセルを設定せずに測定をおこなう。評価に用いる結合量として、溶液効果の影響を受けない解離領域における結合量を利用する。なお、非特異的吸着を差し引く等の目的で、リファレンスセルを設定する場合には、あらかじめウィザードの **Concentration Analysis** のテンプレートで作成したメソッドをメソッドビルダーで開き、リファレンスセルの設定をした上で測定を実施する（6 章を参照）。

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。



Assay → **Concentration Analysis** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。



1 サイクル分の測定シークエンスを設定する。

Detection

Flow path　濃度測定をおこなうフローセルを設定する。リファレンスセルの差し引きはできない。

Chip

Chip type　利用するセンサーチップを選択する。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドをトラップする場合にチェックを入れる。

Sample

アナライトの添加

Enhancement

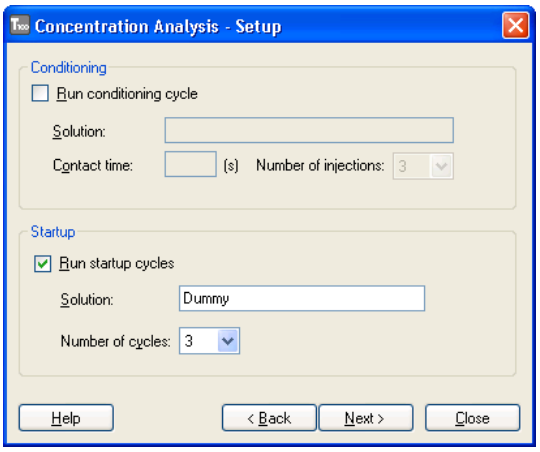
2 次抗体などを添加する場合にチェックを入れる

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れる。添加回数 1 回または 2 回。

Next >をクリックする。

↓



Conditioning

指定した溶液（通常、再生溶液）で、チップ表面のコンディショニングをおこなう。

Solution　溶液名

contact time　添加時間（s）

Number of injections　添加回数

Startup

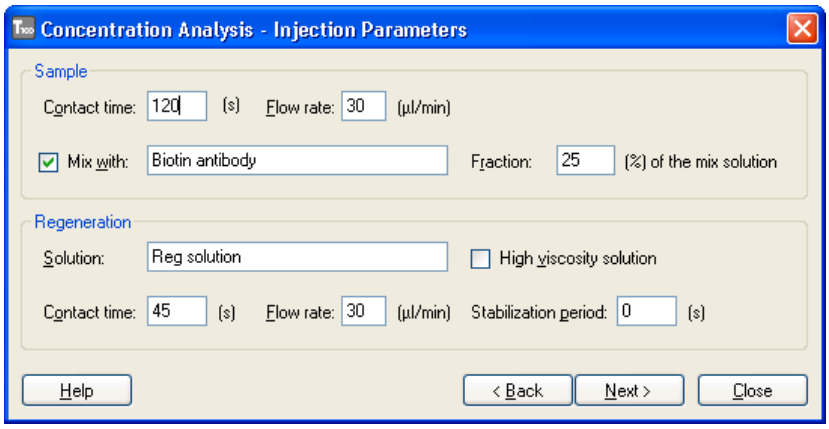
指定した溶液（通常、ランニング緩衝液）で、サンプル測定と同様の工程をサン

プル（アナライト）測定前に実施する。

Solution	溶液名
Number of cycles	サイクル数。3 回以上を推奨する。

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



Sample

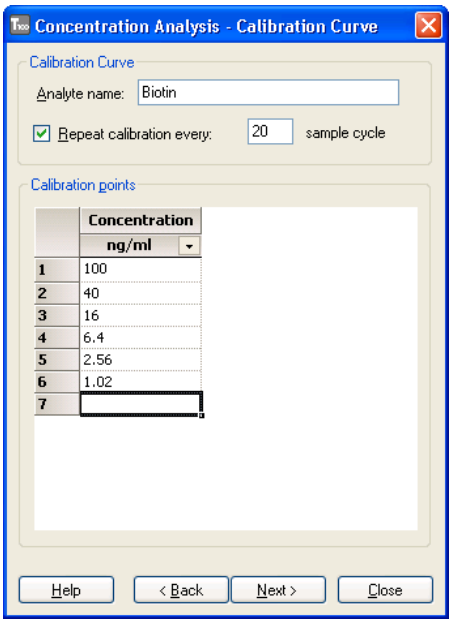
contact time	アナライトの添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Mix with	チェックを入れると、測定直前にサンプルと混合溶液を自動混合する（阻害法による定量の場合に使用）。**Fraction** に混合後の溶液に対する、混合溶液の割合（%）を入力する。 （例）75%と入力した場合：サンプル 25%、混合溶液 75%

Regeneration

Solution	再生溶液の名称
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40% エチレングリコール以上）の場合はチェックを入れる
contact time	再生溶液の添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Stabilization perion	添加終了後のベースライン安定化時間（s）

設定後、**Next >**をクリックする。

↓



Calibration Curve

Analyte name　アナライト（既知濃度サンプル）の名称

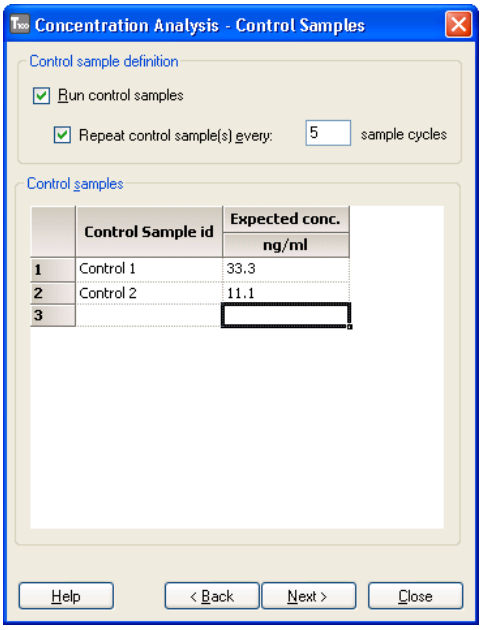
Repeat calibration every　既知濃度サンプルでの検量線作成頻度。
指定したサンプル数ごとに検量線を実施する。チェックを入れない場合には、サンプル測定前に 1 度検量線を測定する。

Calibration points

Concentration　単位をプルダウンで選択して、濃度を入力する。
6 段階濃度以上、測定回数 2 回以上の繰り返し測定を推奨する。
テーブルに入力した順番で測定は実行する。

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



Control Sample definition

Run control Samples

コントロールサンプルを測定する際にチェックする

Repeat control Sample（s） every

測定頻度を入力

コントロールは 20 サンプル程度ごとに入れる

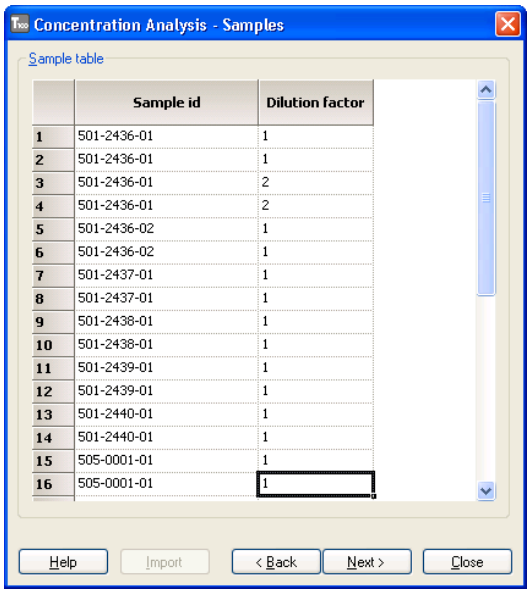
Control Samples

Control Sample id　コントロールサンプルの名称

Expected conc.　コントロールサンプルの濃度

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



Sample id　　サンプルの名称

Dilution factor　　サンプルの希釈倍率

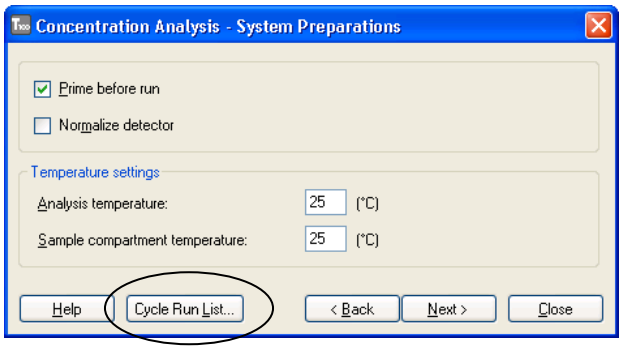
テーブルに入力した順番で測定は実行する。

入力後、**Next >**をクリックする。

↓

補足 5-30. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

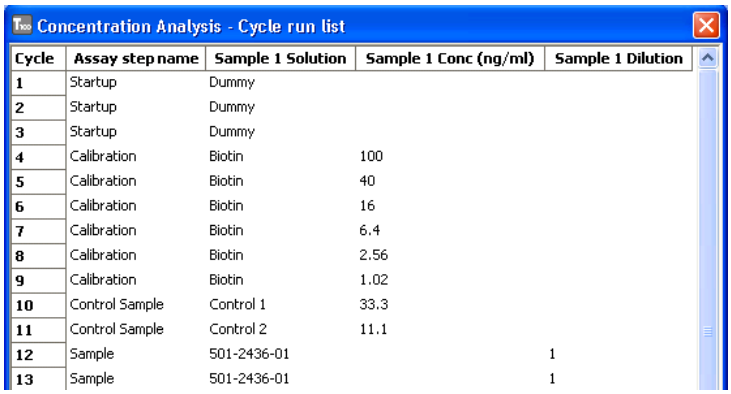


測定を始める前の **Prime** および **Normalize** の選択をおこなう。

Analysis temperature　　25 ℃

Sample compartment temperature　　25 ℃

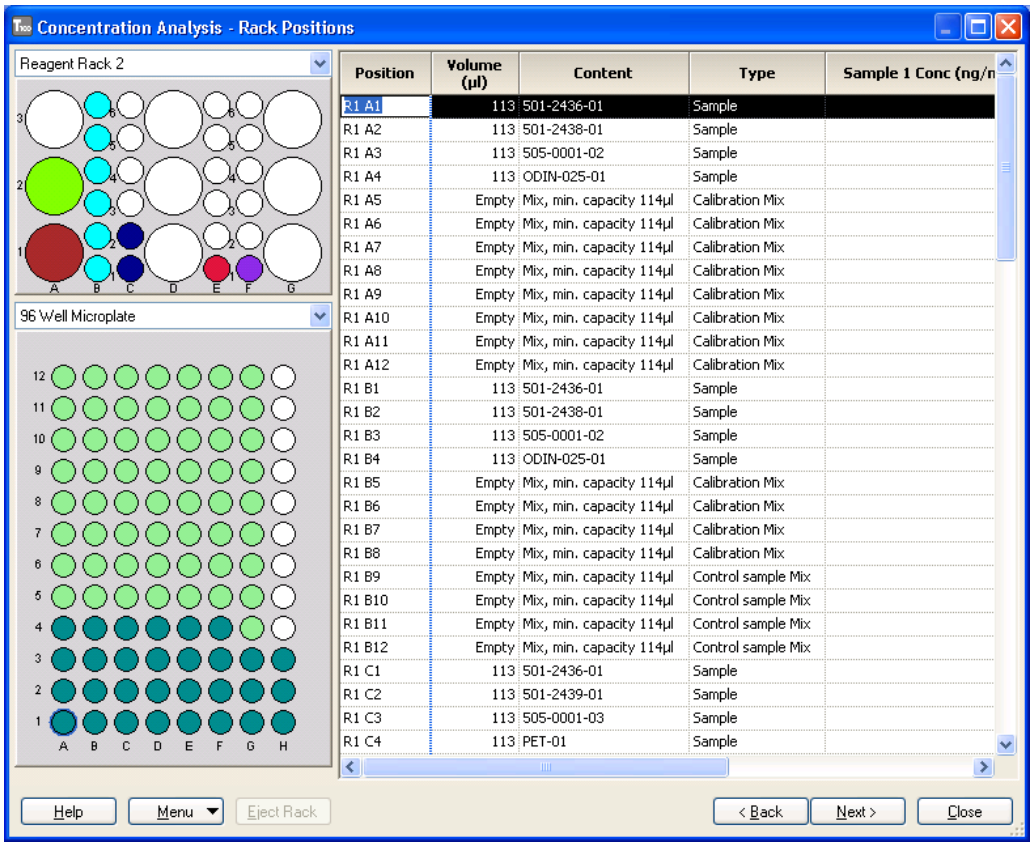
Cycle Run List...をクリックすると、測定サイクルの確認がおこなる。



Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 Conc (ng/ml)	Sample 1 Dilution
1	Startup	Dummy		
2	Startup	Dummy		
3	Startup	Dummy		
4	Calibration	Biotin	100	
5	Calibration	Biotin	40	
6	Calibration	Biotin	16	
7	Calibration	Biotin	6.4	
8	Calibration	Biotin	2.56	
9	Calibration	Biotin	1.02	
10	Control Sample	Control 1	33.3	
11	Control Sample	Control 2	11.1	
12	Sample	501-2436-01		1
13	Sample	501-2436-01		1

Next >をクリックする。

↓



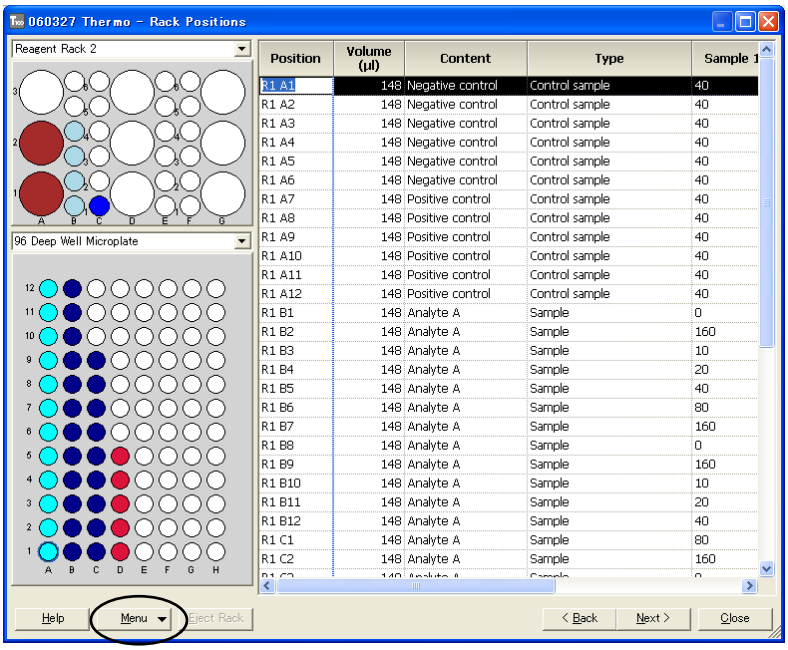
右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-31. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...** を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

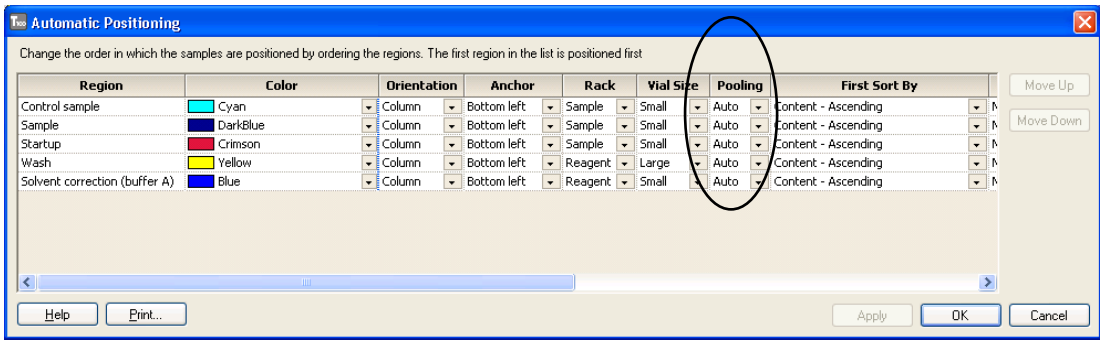
補足 5-32. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu から Automatic Positioning...を選ぶ。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定をおこなうことができる。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっている。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックする。

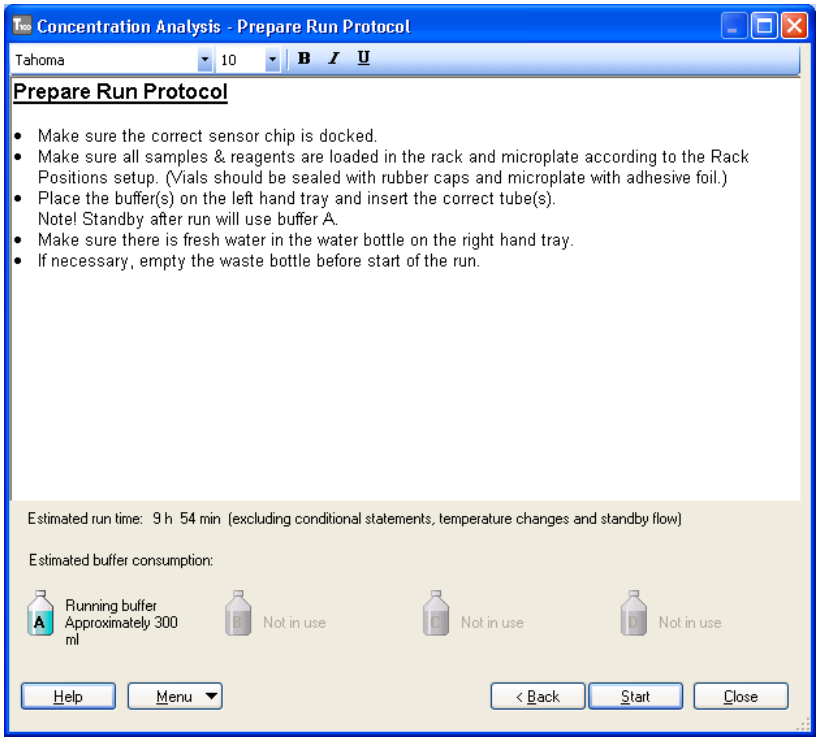
なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。
Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックする。

↓


Concentration Analysis - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tube(s).
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 9 h 54 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
A
Running buffer
Approximately 300 ml
B
Not in use
C
Not in use
D
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液の量が表示される。
Start をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

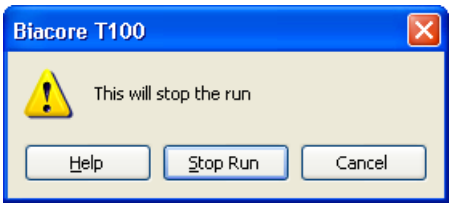
終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示される。

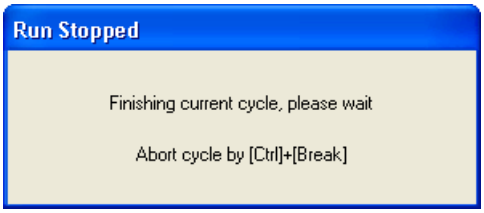
補足 5-33. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。



ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

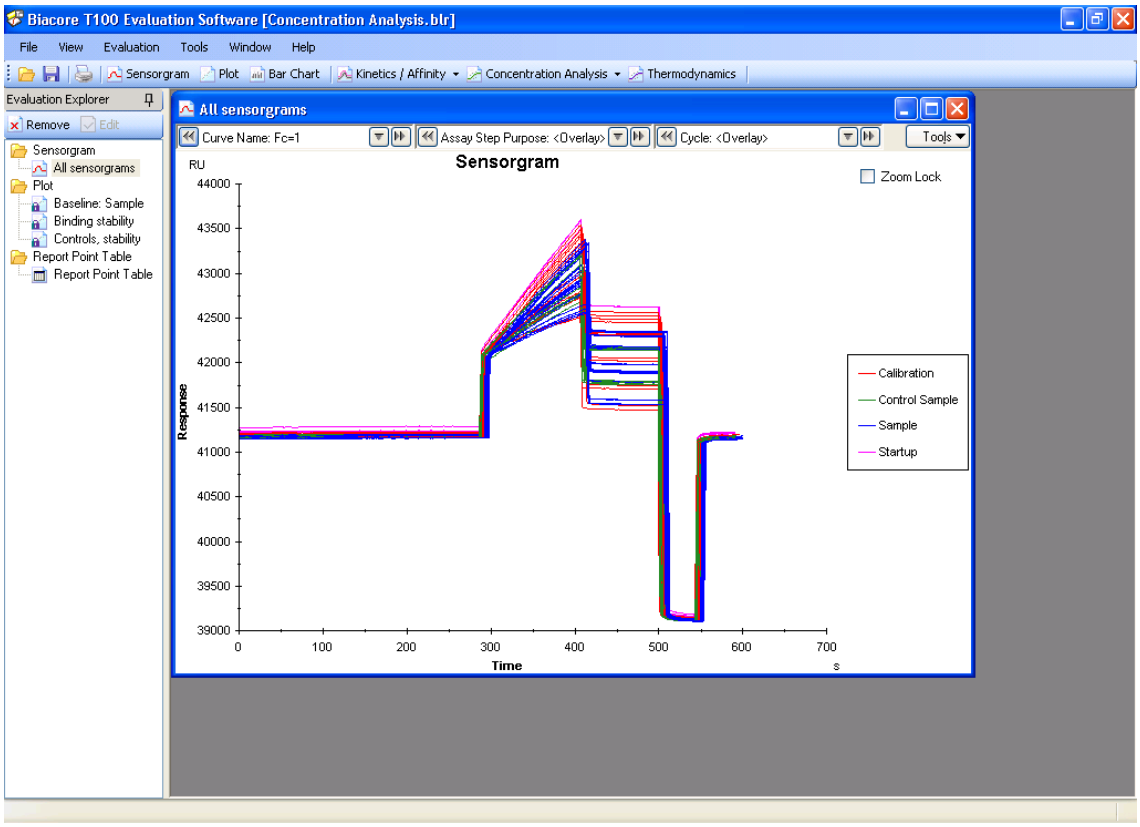
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

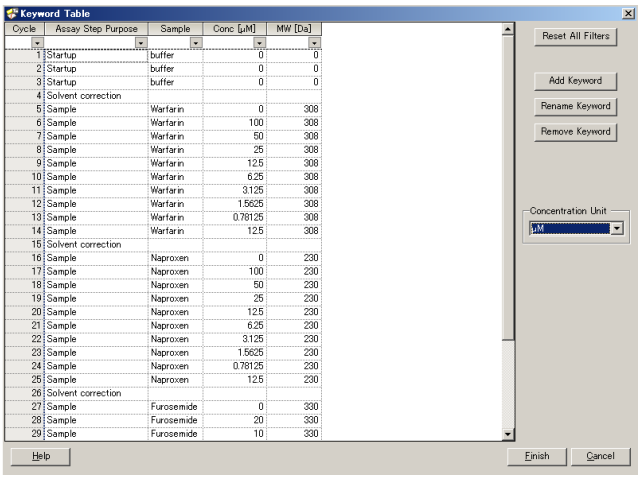
5-3-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、自動保存された取得データが開かれる。

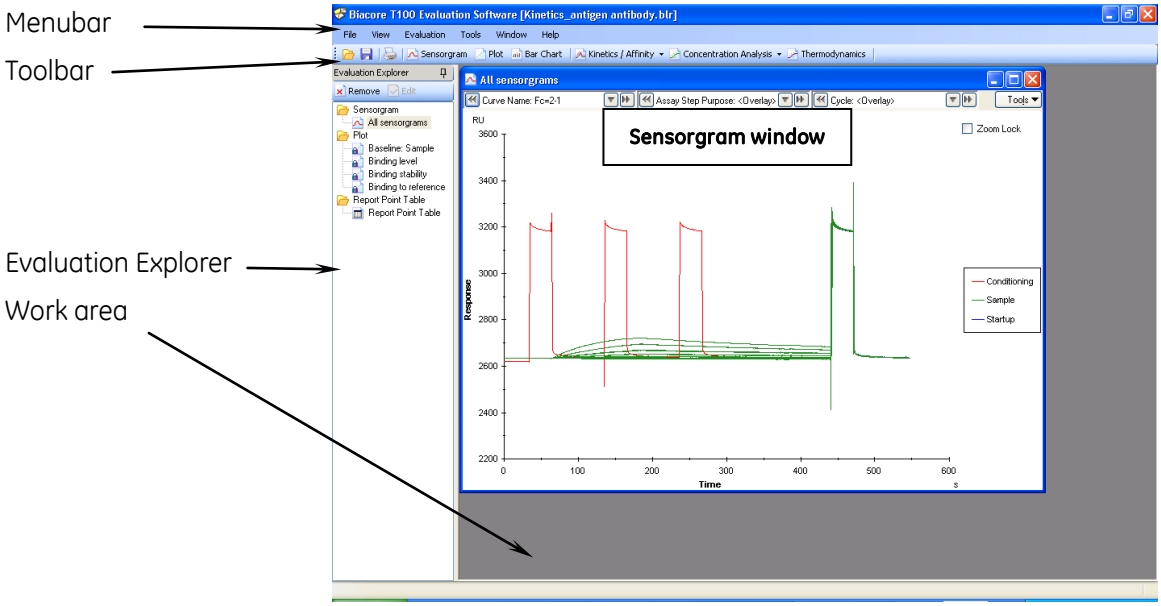


補足 5-34. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table...**で変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。



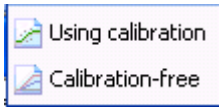
補足 5-35. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

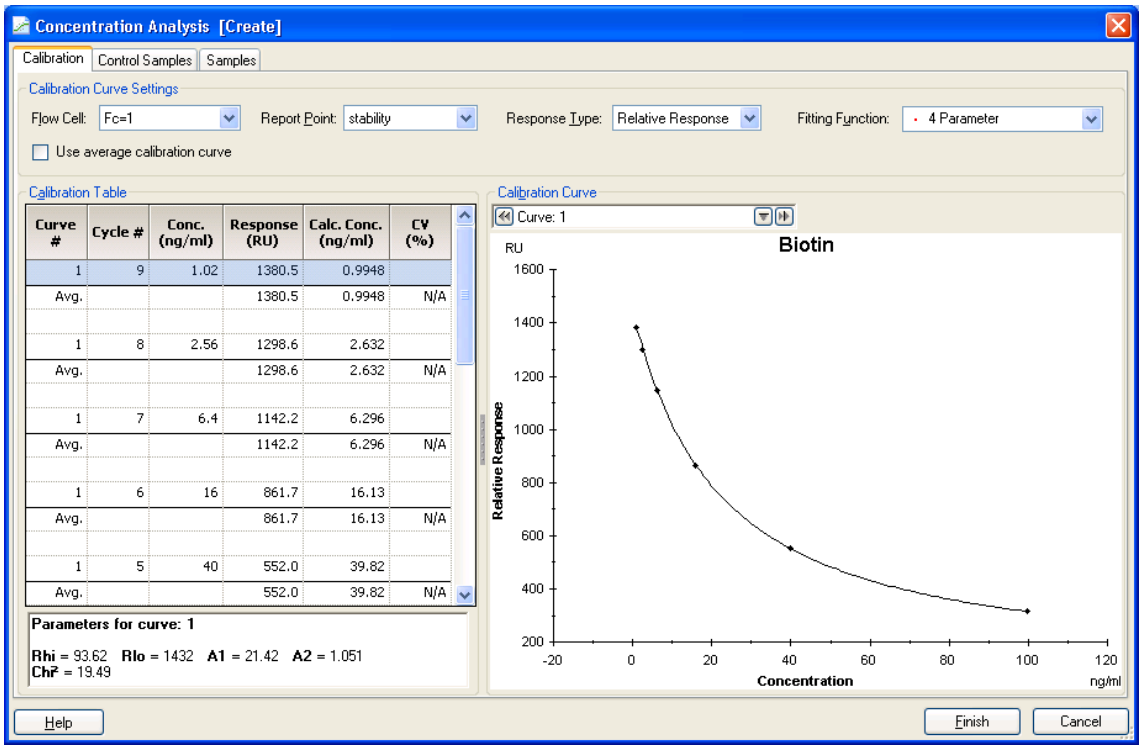
Toolbar の

をクリックする。



Using calibration をクリックする。

↓



Concentration Analysis［Create］ボックスの **Calibration** が表示される。

Calibration Curve Settings

Flow cell　解析に利用するセルの選択

Report point　レポートポイントの選択

Response type　結合レスポンス（Relative Response）で濃度測定するか、傾き（Slope）で濃度測定するか選択する。

Fitting Function　検量線を linear で引くか、4-parameter で引くか選択する。

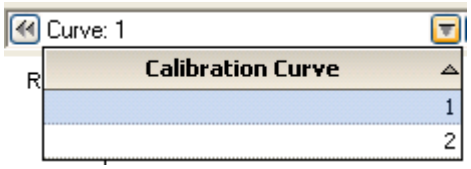
Use average calibration Curve

検量線を複数作成していて平均した検量線を利用する場合にチェックを入れる。チェックを入れない場合には、サンプル測定の直前で測定した検量線を利用する。

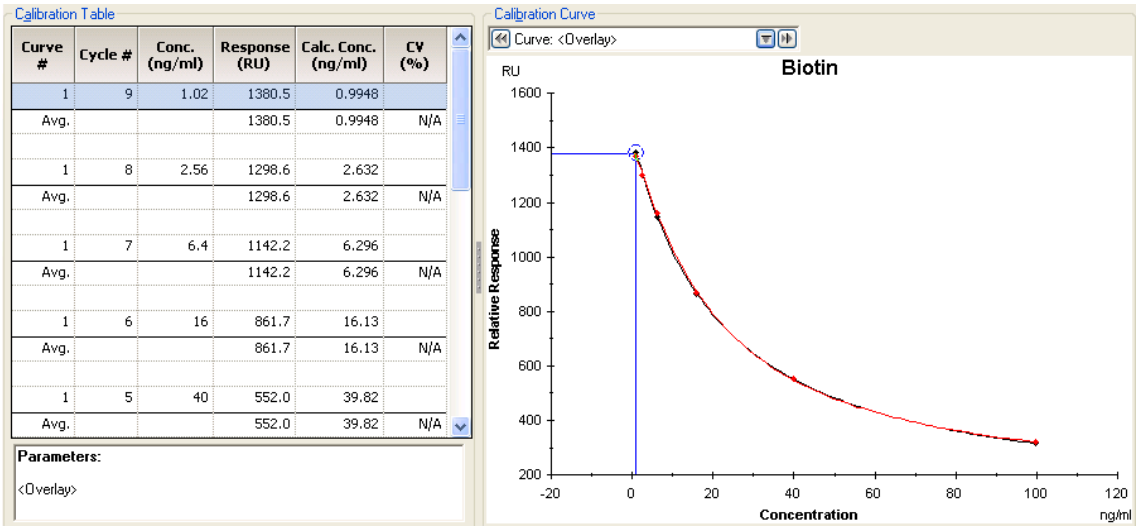
設定した条件での検量線の確認をおこなう。

Calibration Curve

の もしくは をクリックし、目的のサイクルを選択する。複数の検量線を同時に確認する場合は、 を使用する。



キーボードの Ctrl キーを押しながら、カラム中の目的の番号をクリックする。連続した番号を選択する場合は、マウスをドラッグして選択可能。



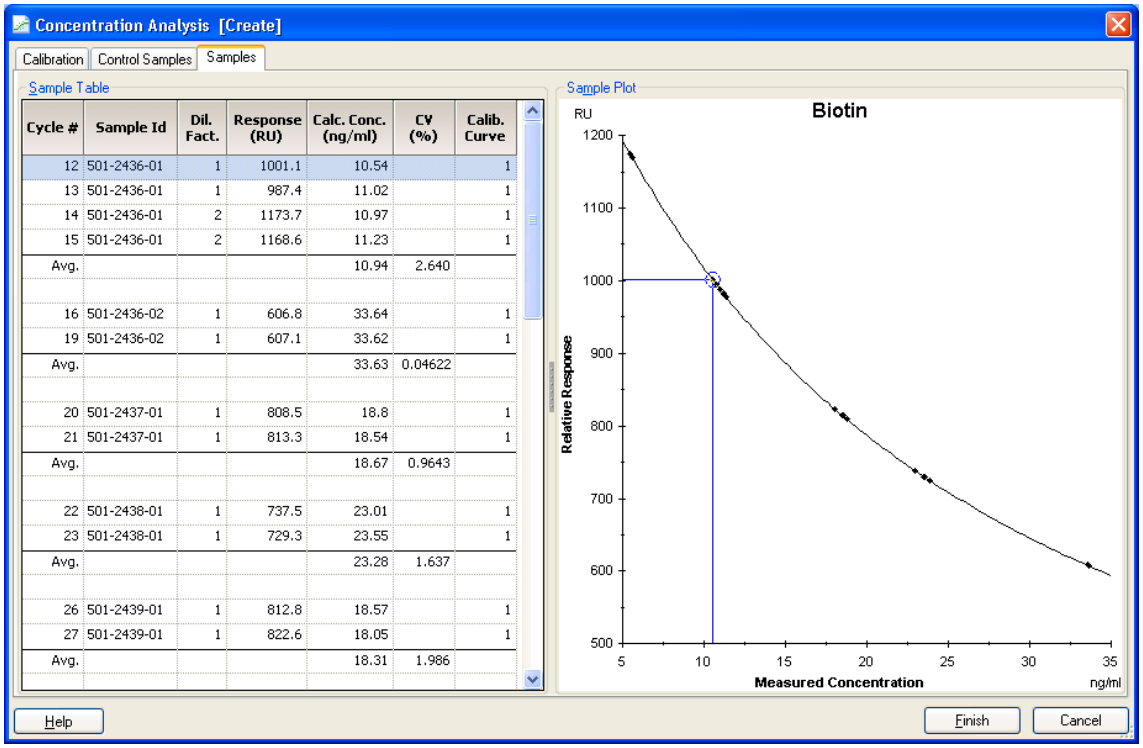
画面右に設定した検量線が表示される。

画面左の **Calibration Table** に検量線の各測定ポイントの詳細情報が表示される。**Conc.**にはメソッドで入力した濃度、**Calc.Conc.**には作成した検量線から計算した濃度が表示される。同一濃度で繰り返し測定をおこなっている場合には、算出された濃度の CV 値が **CV（%）**に表示される。

検量線の測定ポイントの選択削除、検量線の選択削除は、補足 5-36 および 5-37 を参照のこと。

未知サンプルの測定結果

Concentration Analysis［Create］ボックス上部の Samples のタブの付いたページをクリックする。



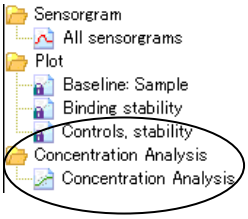
Cycle #	Sample Id	Dil. Fact.	Response (RU)	Calc. Conc. (ng/ml)	CV (%)	Calib. Curve
12	501-2436-01	1	1001.1	10.54		1
13	501-2436-01	1	987.4	11.02		1
14	501-2436-01	2	1173.7	10.97		1
15	501-2436-01	2	1168.6	11.23		1
Avg.				10.94	2.640	
16	501-2436-02	1	606.8	33.64		1
19	501-2436-02	1	607.1	33.62		1
Avg.				33.63	0.04622	
20	501-2437-01	1	808.5	18.8		1
21	501-2437-01	1	813.3	18.54		1
Avg.				18.67	0.9643	
22	501-2438-01	1	737.5	23.01		1
23	501-2438-01	1	729.3	23.55		1
Avg.				23.28	1.637	
26	501-2439-01	1	812.8	18.57		1
27	501-2439-01	1	822.6	18.05		1
Avg.				18.31	1.986	

画面左の **Sample Table** にサンプル情報が表示される。Dil.Fact.（希釈倍率）を掛けた濃度が Calc.Conc.に表示される。同一サンプルで繰り返し測定をおこなっている場合には、算出された濃度の CV 値が **CV（%）**に表示される。
クリックして選択したサンプルについては、画面右で強調表示される。
測定ポイントの選択削除は、補足 5-36 を参照のこと。

Finish をクリックする。

↓

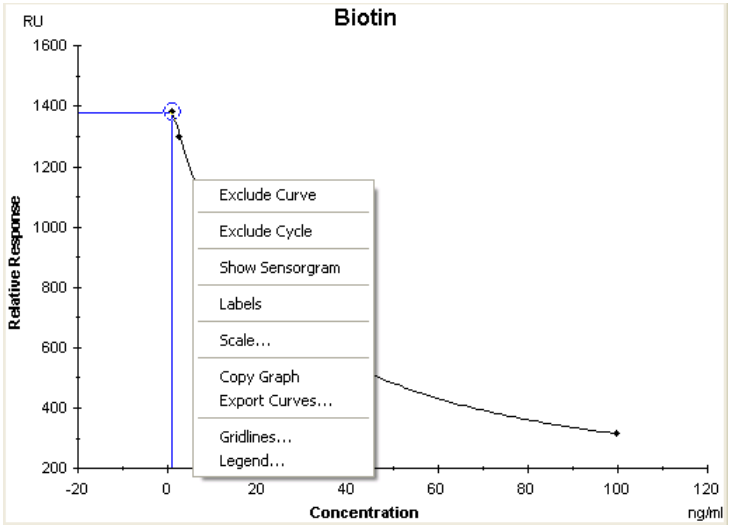
解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに保存される。



解析結果を改めて見る場合は、Evaluation Explorer の Concentration Analysis フォルダ内の目的ファイルをクリックする。

補足 5-36. 測定ポイントの削除

エアーの混入などの理由で、測定結果から削除したい測定ポイントがある場合は、その測定ポイント上にカーソルを移動し、マウスを右クリックする。



Exclude Cycle をクリックする。

↓

測定ポイントが削除され、同時に **Calibration Table** の削除した測定ポイントに赤色の削除ラインが引かれる。

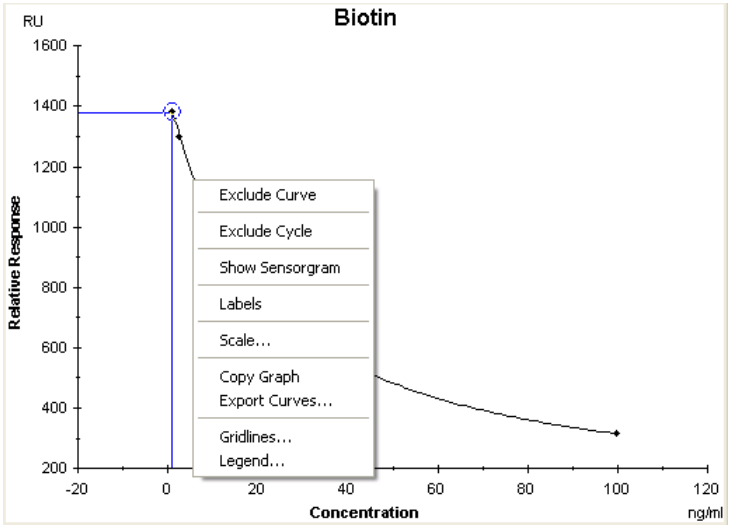
Curve #	Cycle #	Conc. (ng/ml)	Response (RU)	Calc. Conc. (ng/ml)	CV (%)
1	9	1.02	1380.5	1.017	
Avg.			1380.5	1.017	N/A
1	8	2.56	1298.6	2.565	
Avg.			1298.6	2.565	N/A
~~1~~	~~7~~	~~6.4~~	~~1142.2~~		
Avg.					
1	6	16	861.7	15.99	
Avg.			861.7	15.99	N/A
1	5	40	552.0	40.02	
Avg.			552.0	40.02	N/A

検量線の測定ポイントを削除した場合には、改めて残りの測定ポイントで検量線が作り直される。

再度採用する場合には、マウスを右クリックして、**Include Cycle** を選択する。

補足 5-37. 検量線の削除

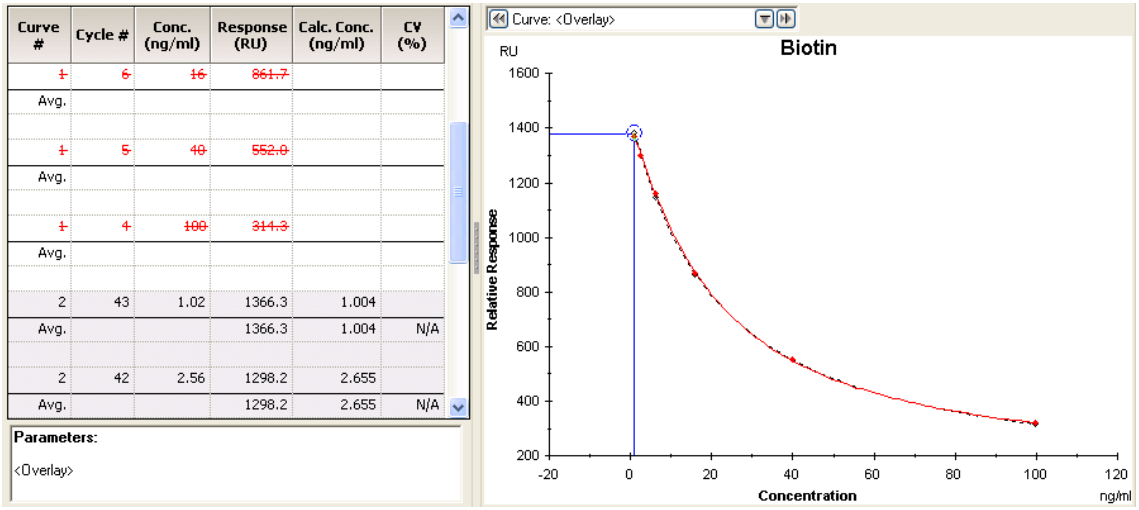
エアーの添加などの理由で、複数回数取得している検量線のうち、解析から削除したい検量線がある場合、いずれかの測定ポイント上でマウスを右クリックする。



Exclude Curve をクリックする。

↓

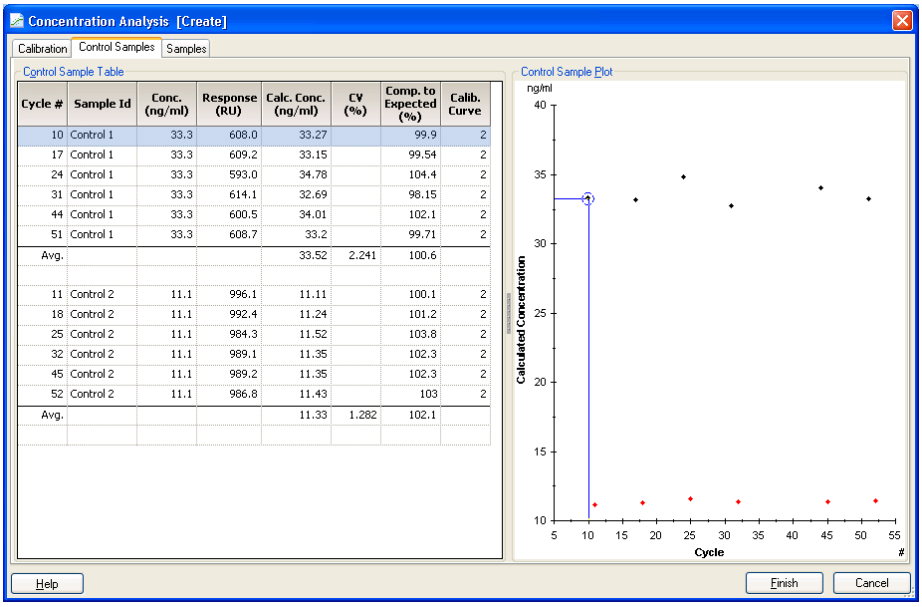
検量線は削除され、同時に **Calibration Table** のその検量線を構成している全測定ポイントに赤色の削除ラインが引かれる。



再度採用する場合には、マウスを右クリックして、**Include Curve** を選択する。

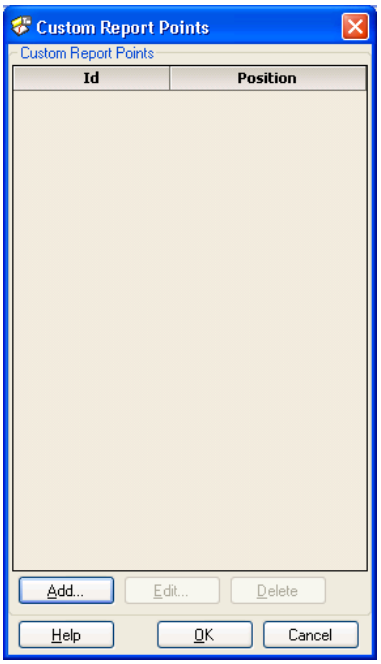
補足 5-38. コントロールサンプルのレスポンスのチェック

定期的にコントロールサンプルを添加している場合、その結合レスポンスを **Concentration Analysis** ［**Create**］ボックス上部の **Control Samples** のタブの付いたページでチェックすることができる。


Concentration Analysis [Create]
Calibration
Control Samples
Samples
Control Sample Table
Cycle # | Sample Id | Conc. (ng/ml) | Response (RU) | Calc. Conc. (ng/ml) | CV (%) | Comp. to Expected (%) | Calib. Curve
10 | Control 1 | 33.3 | 608.0 | 33.27 | | 99.9 | 2
17 | Control 1 | 33.3 | 609.2 | 33.15 | | 99.54 | 2
24 | Control 1 | 33.3 | 593.0 | 34.78 | | 104.4 | 2
31 | Control 1 | 33.3 | 614.1 | 32.69 | | 98.15 | 2
44 | Control 1 | 33.3 | 600.5 | 34.01 | | 102.1 | 2
51 | Control 1 | 33.3 | 608.7 | 33.2 | | 99.71 | 2
Avg. | | | | 33.52 | 2.241 | 100.6 |
11 | Control 2 | 11.1 | 996.1 | 11.11 | | 100.1 | 2
18 | Control 2 | 11.1 | 992.4 | 11.24 | | 101.2 | 2
25 | Control 2 | 11.1 | 984.3 | 11.52 | | 103.8 | 2
32 | Control 2 | 11.1 | 989.1 | 11.35 | | 102.3 | 2
45 | Control 2 | 11.1 | 989.2 | 11.35 | | 102.3 | 2
52 | Control 2 | 11.1 | 986.8 | 11.43 | | 103 | 2
Avg. | | | | 11.33 | 1.282 | 102.1 |
Control Sample Plot
ng/ml
Calculated Concentration
Cycle
Help
Finish
Cancel

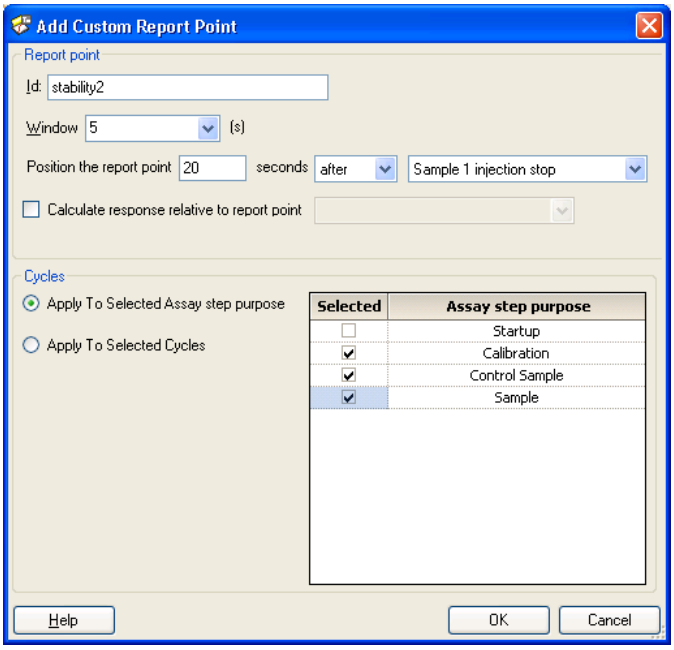
補足 5-39. レポートポイントの追加

Tools → **Custom Report Points...**をクリックする。



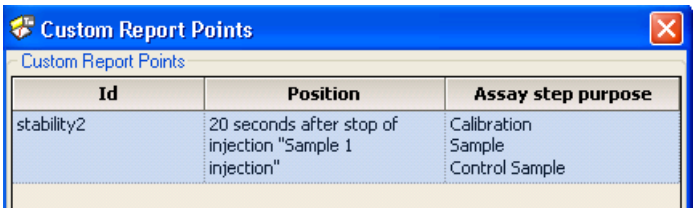
Add...をクリックする。

↓

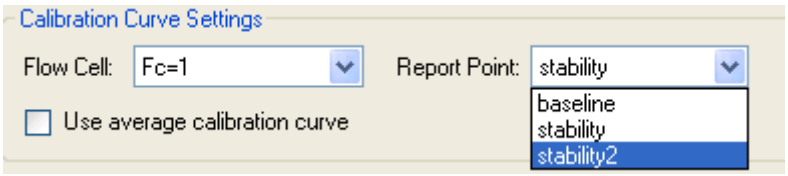


Id にレポートポイントの名前を入力する。追加する位置を設定し、**Cycles** でどのサイクルで記録するか設定する。
OK をクリックする。

↓



初期画面に、追加したレポートポイントが表示される。
なお、追加したレポートポイントは、**Calibaration Settings** の **Report Point** に追加される。



5-4. 検量線不要の濃度測定

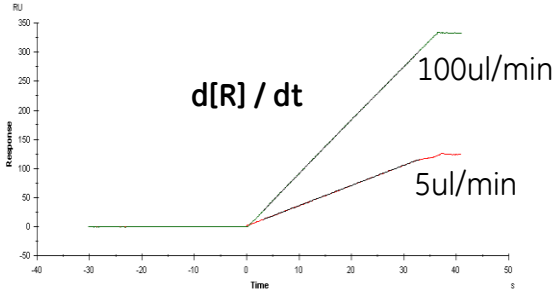
CFCA　(Calibration Free Concentration Analysis)

検量線を必要としない濃度測定法（**CFCA ; Calibration Free Concentration Analysis**） は、アナライトの拡散特性とセンサーグラムの結合領域初期における結合速度（初期結合速度）を利用して、カーブフィッティングにより、結合活性を有するアナライト分子の絶対濃度を算出する方法である。適した標準分子がない場合や、標準サンプルの結合活性濃度を確認したい場合に有効である。さらに、厳密な速度定数と親和定数を求める目的においても、CFCA により絶対的な結合活性濃度を求めることは有効である。

$$\frac{d[R]}{dt} = f\ (M_w,\ k_m,\ Conc)$$

M_W ：分子量（Da）

k_m ：マストランスポート係数



CFCA では、リガンドをできるだけ多く固定化（例：分子量 150kDa で 5000RU 以上）し、マストランスポートリミテーション条件下で測定を実施する。固定化量が多い表面において、初期結合速度は、アナライトの分子量（Mw）、マストランスポート係数（km）、アナライト濃度（Conc）で決定される。このため、上記の初期結合速度（d[R] / dt）の関数を利用してサンプル中のアナライト濃度を算出することができる。

測定は、アナライトを最低 2 流速（5 および 100 µl/min を推奨）で添加して、センサーグラムから初期結合速度を求める。マストランスポート係数（km）は、拡散係数（D）、流速、フローセル容積から計算できる。得られた 2 流速でのセンサーグラムを、1:1 結合モデルで Kinetics 解析をおこない、アナライトの分子量（Mw）、km 値を定数とし、アナライト濃度をパラメータとしてカーブフィッティングをおこなうことで濃度を算出する。なお、アナライトが抗体（Bivalent Analyte）であっても、マストランスポートリミテーション条件下で、カーブフィッティングが良好であれば、CFCA を実施することができる。

参考文献：

Christensen, Anal. Biochemistry　(1997) 249, p.153

Sigmundsson, K., *et. Al.,* Biochemistry　(2002)　41, p.8263

CFCA を実施するための至適条件

① アナライト	分子量　≧ 5,000Da
② 結合速度定数（k_a）	$10^7 > k_a > 5 \times 10^4\ M^{-1}s^{-1}$
③ 固定化量	できるだけ多く固定化する。 （分子量 150kDa では、5,000RU 以上は必要。）
④ アナライト濃度	CFCA で良好な結果が得られる濃度レンジは、0.05～5 µg/ml である。測定に用いるサンプル濃度は、1 µg/ml 程度が至適である。吸光度（280 nm）による総タンパク質濃度を基準として調製する。濃度が不明な場合には、10 倍希釈系列で 4 濃度以上調製すると良い。
⑤ 流速	5 µl/min および 100 µl/min を推奨。
⑥ サンプルの性状	拡散係数や分子量が大きく異なる分子の混合溶液の場合には CFCA は実施できない。 例）アナライトが IgG のポリクローナル抗体の場合には CFCA は可能だが、アナライトが IgG と IgM の混合溶液の場合には CFCA は不可能。
⑦ リファレンスセル	リファレンスセルも同時測定をおこない、リファレンスセルを差し引いたセンサーグラムを利用して CFCA をおこなう。
⑧ 非特異的吸着	非特異的吸着が起きている場合には正確な濃度が算出できない。

補足 5-40. マストランスポート、マストランスポートリミテーションとは

マストランスポートとは、フローセルを流れる溶液中からセンサーチップ表面への、アナライトの拡散現象を指す。アナライトのセンサーチップ表面への拡散（供給）速度は、次式で求められる。

アナライトの拡散速度（mol/m²s）＝アナライト濃度 × マストランスポート係数（km）

マストランスポート係数は、次式で求められる。

$$k_m = 0.98 \times \sqrt[3]{\frac{D^2 \times f}{0.3 \times h^2 \times w \times l}}$$

D　：拡散係数　　f　：測定流速　　h：フローセルの高さ

w　：フローセルの幅　　l　：フローセルの長さ

なお、アナライトの拡散速度よりも、センサーチップ表面のリガンドとの結合速度が速い場合、マストランスポートが結合速度を制限するため、**マストランスポートリミテーション**が起きているという。リガンドの固定化量が多い場合には、マストランスポートリミテーションが起こりやすい。

補足 5-41. 拡散係数の求め方

CFCA をおこなう場合、20℃における拡散係数がパラメータとして必要である。
拡散係数は、分子のサイズと形状によって決定され、次式によって算出できる。

$$D = \frac{324.3\times10^{-11}}{f\times\eta_{rel}\times M_w^{1/3}} \quad (m^2/s)$$

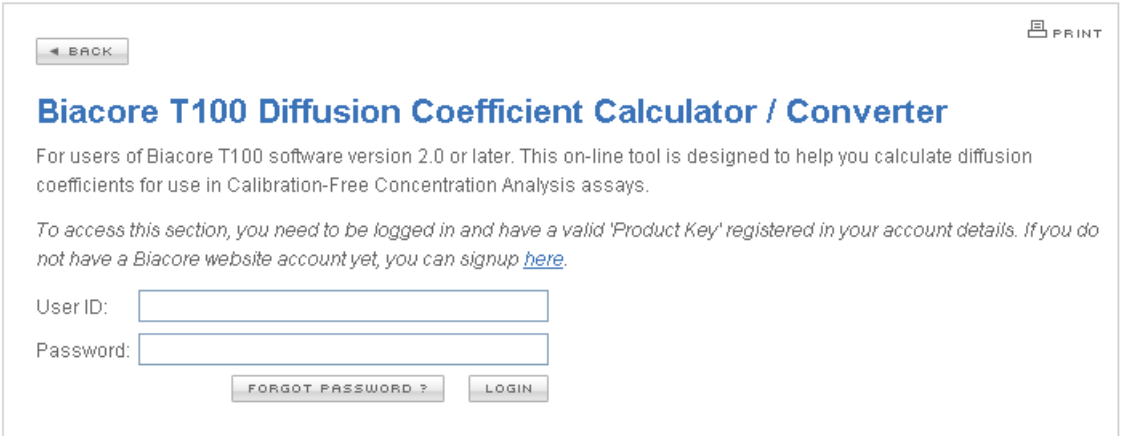
f　　：摩擦率
η_{rel}　：20℃での水に対するアナライト溶媒の粘性
Mw　　：分子量（Da）

なお、以下の方法でも拡散係数を得ることができる。
① Biacore ウェブの Biacore T100 の拡散係数算出ツール
② 文献値
③ 実験的に算出（超遠心分析や光散乱分析など）

Biacore ウェブの Biacore T100 の拡散係数算出ツールによる拡散係数の求め方

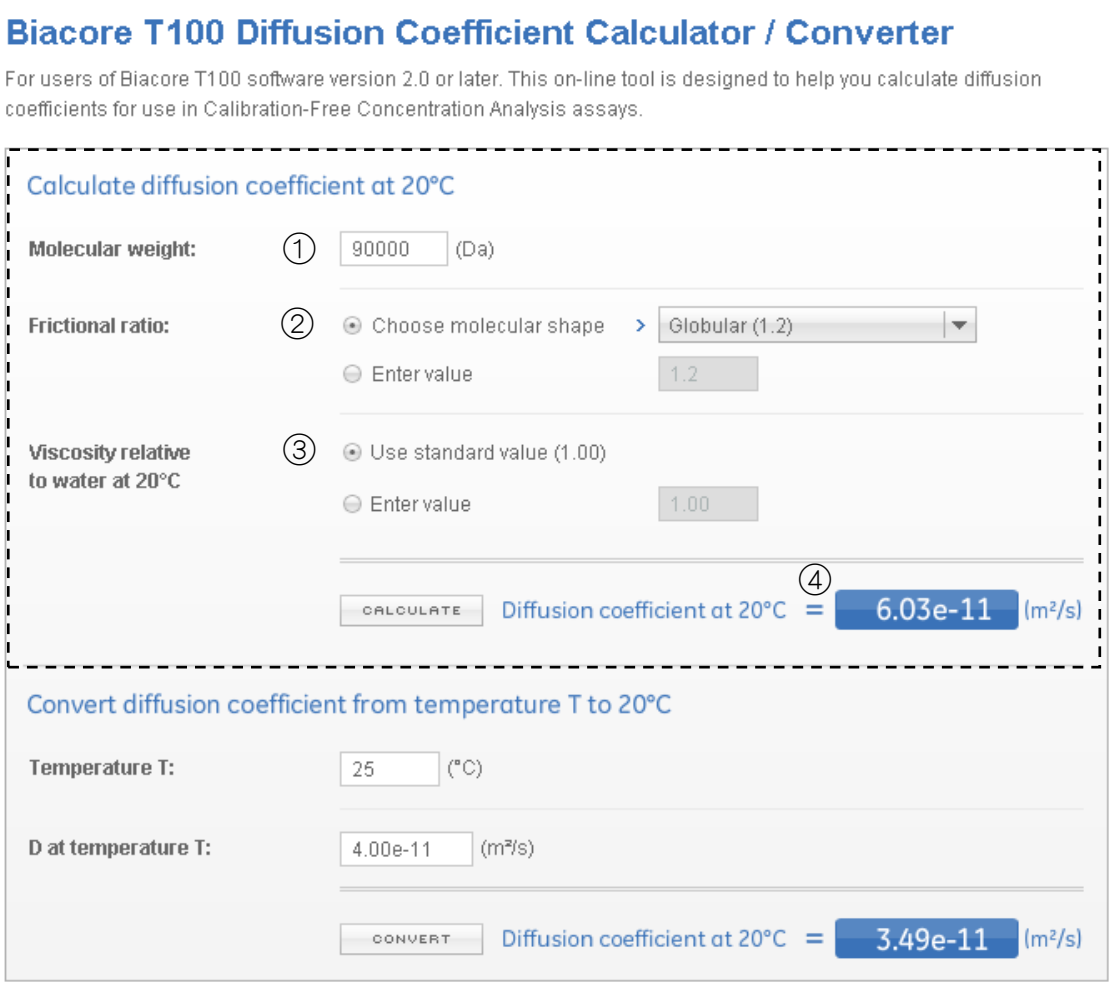
次のアドレスにアクセスする。
http://www.biacore.com/diffusion_calculator

↓


PRINT
BACK
Biacore T100 Diffusion Coefficient Calculator / Converter
For users of Biacore T100 software version 2.0 or later. This on-line tool is designed to help you calculate diffusion coefficients for use in Calibration-Free Concentration Analysis assays.
To access this section, you need to be logged in and have a valid 'Product Key' registered in your account details. If you do not have a Biacore website account yet, you can signup here.
User ID:
Password:
FORGOT PASSWORD ?
LOGIN

ユーザー名（User ID）とパスワード（Password）を入力して、**LOGIN** をクリックする。（事前に、ユーザー登録が必要。）

↓



画面上で、20℃における拡散係数を算出する。

① **Molecular weight:**　分子量（Da）を入力する。

② **Friction ratio:**　摩擦率。

〇**Choose molecular shape** にチェックを入れ、

の▼をクリックして該当の値を選択する。以下の、3 項目から選択できる。

- **Globular　(1.2)**・・・球形のタンパク質（初期設定値）
  例）抗体など
- **Moderately elongated　(1.7)**・・・長いタンパク質
  例）フィブロネクチンやプラスミノーゲンなど
- **Elongated　(2.5)**・・・硬く、長いタンパク質
  例）フィブリノーゲンやトロポミオシンなど

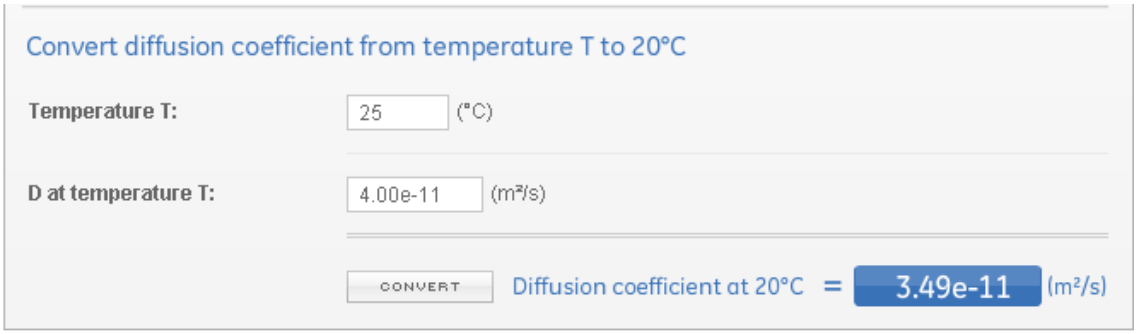
〇 **Enter value** にチェックを入れると、任意の値を入力できる。

③ **Viscosity relative to water at 20℃**

20℃における水に対するアナライト溶媒の粘性。○ **Use standard value （1.00）** にチェックを入れると、粘性係数を 1 とする。（初期設定値）

○ **Enter value** にチェックを入れると、任意の値を入力できる。

①～③の設定が終了したら、CALCULATE をクリックし計算を実行する。④に計算結果が表示される。

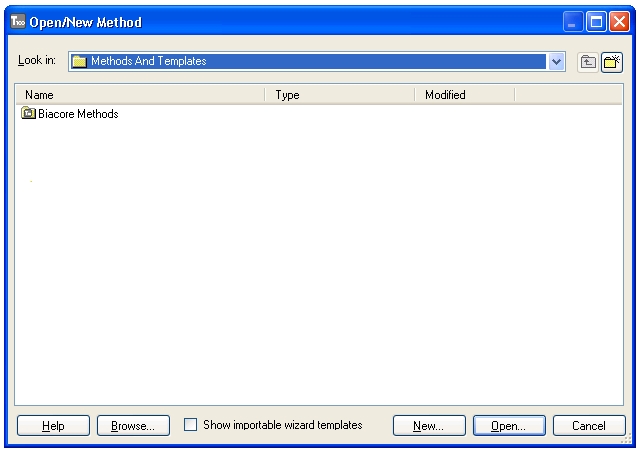


画面下では、任意の温度における拡散係数から、20℃における拡散係数を算出することができる。文献や実測によって、20℃以外での拡散係数が得られている場合に利用する。

5-4-1. プログラムの実行

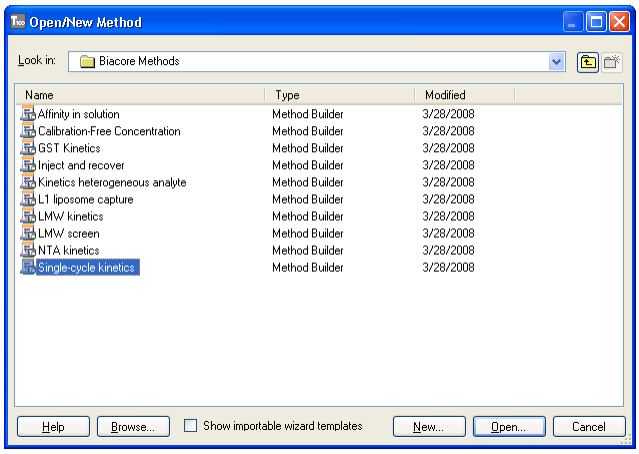
Toolbar の **Run Method** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Method...**をクリックする。

↓



Biacore Methods を選択した後、**Open...**をクリックする。

↓



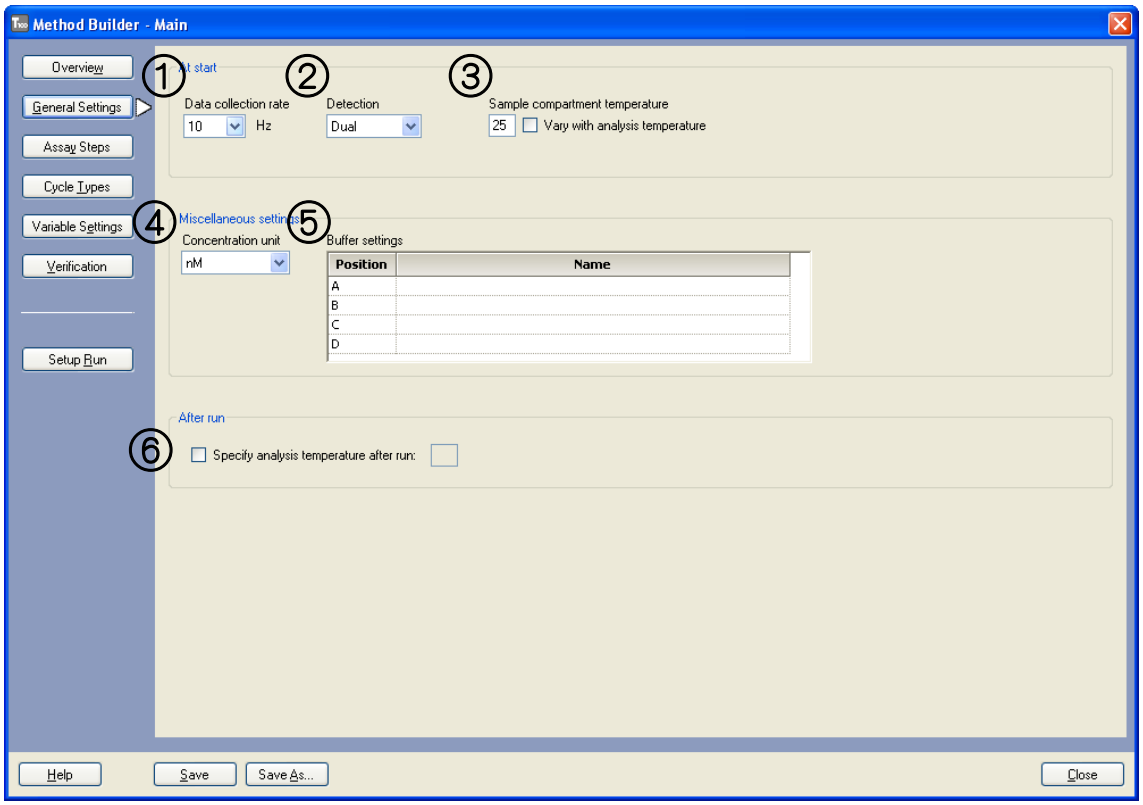
Calibration-Free Concentration を選択した後、**Open...**をクリックする。

↓

Method Builder の **Main** ダイアログが表示される。**Overview** 画面にはメソッド全体の設定項目が表示される。以下に変更項目について記載する。詳細は 6 章を参照。

↓

General Settings をクリックする。



① **Data Collection rate**

10Hz を選択。

② **Detection**

検出モードを以下の 2 つ（Dual,Multi）から選択する。

Dual　2-1、4-3

Multi　2-1,4-3、2-1,3-1,4-1

③ **Sample compartment temperature**

サンプルコンパートメントの温度（4～45℃）を設定。通常は、25℃。

④ **Concentration unit**

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択。

⑤ **Buffer settings**

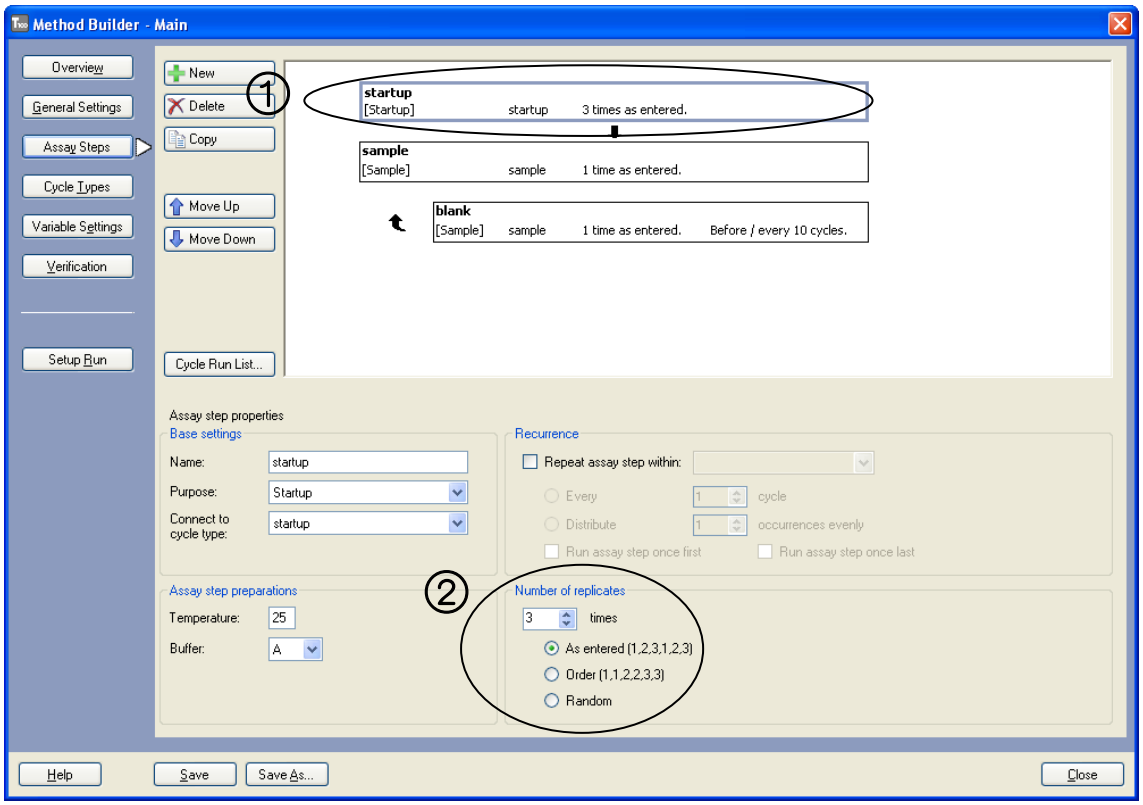
使用するランニング緩衝液名を入力。

⑥ **After run**

チェックを入れておくと、全測定が終了した後に、センサー表面の温度が指定した温度に自動変更される。

設定後、**Assay Steps** をクリックする。

↓



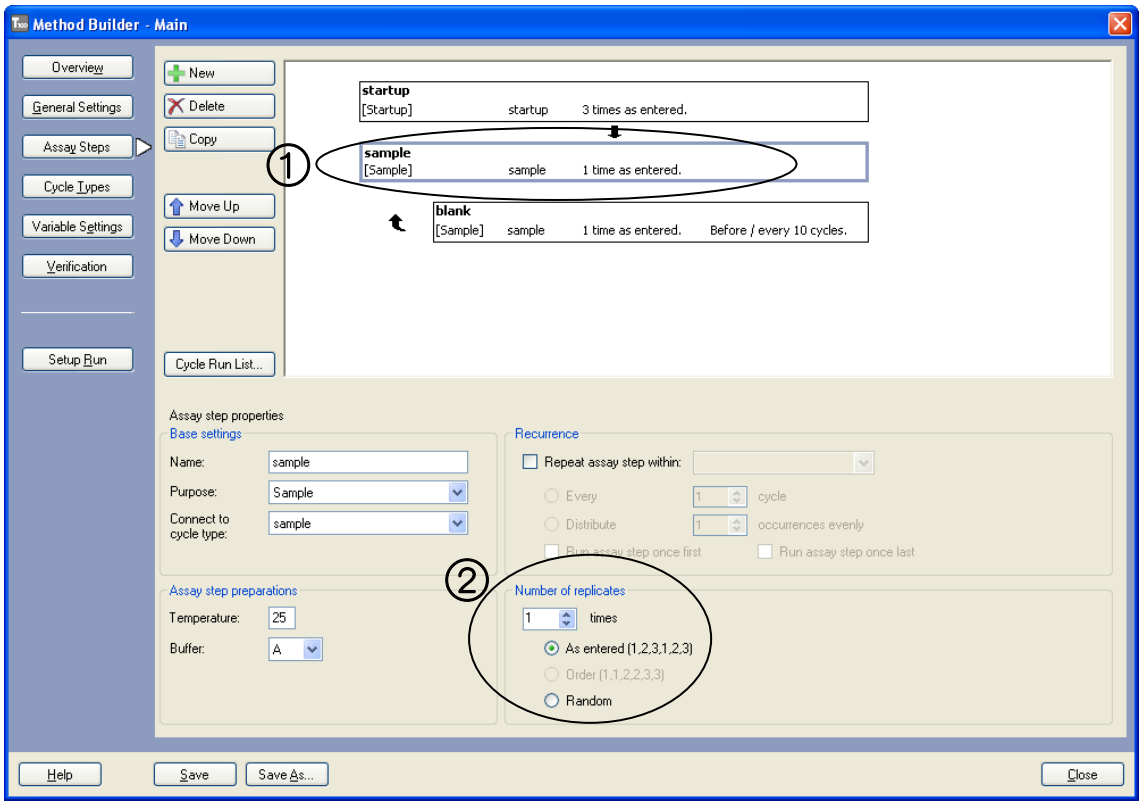
① **Startup** を選択する。

② 下記設定をおこなう。

Number of replicates

times　　ベースライン安定化のためのスタートアップの測定回数を指定する。3 回以上を推奨。

↓



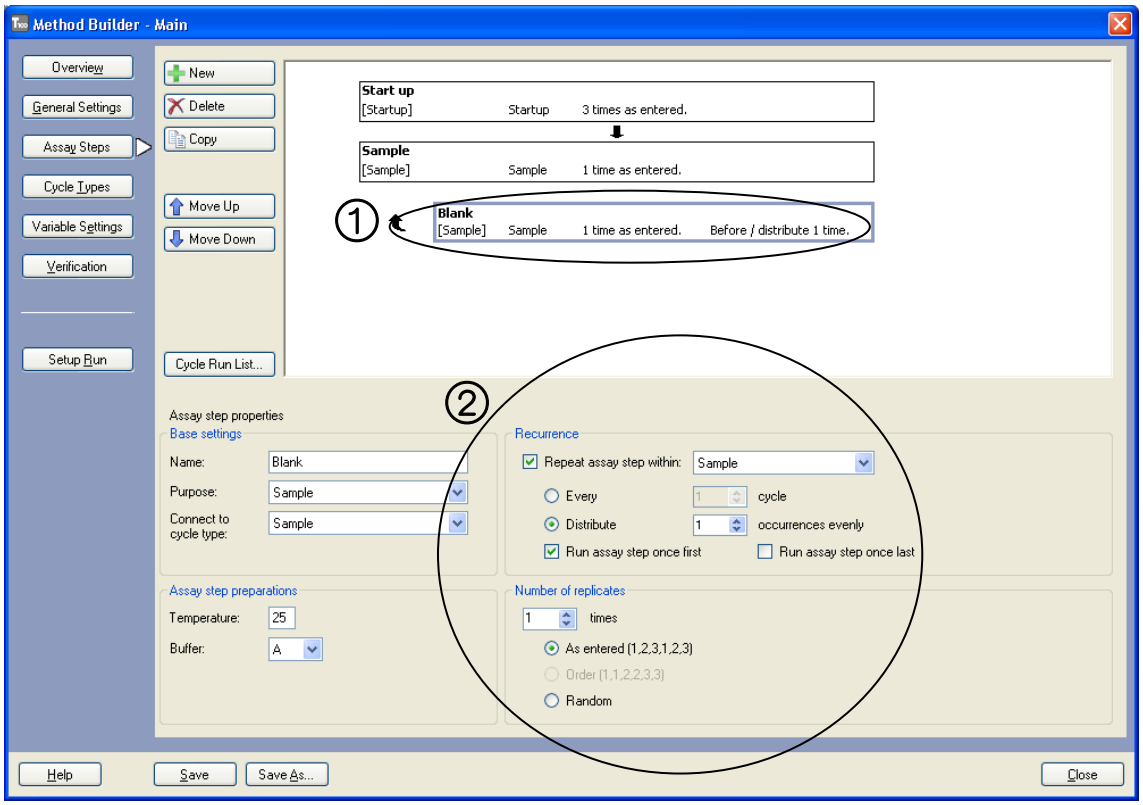
① **Sample** を選択する。

② 下記設定をおこなう。

Number of replicates

times　　繰り返し測定回数を選択する。

↓



① **blank** を選択する。

② 下記設定をおこなう。

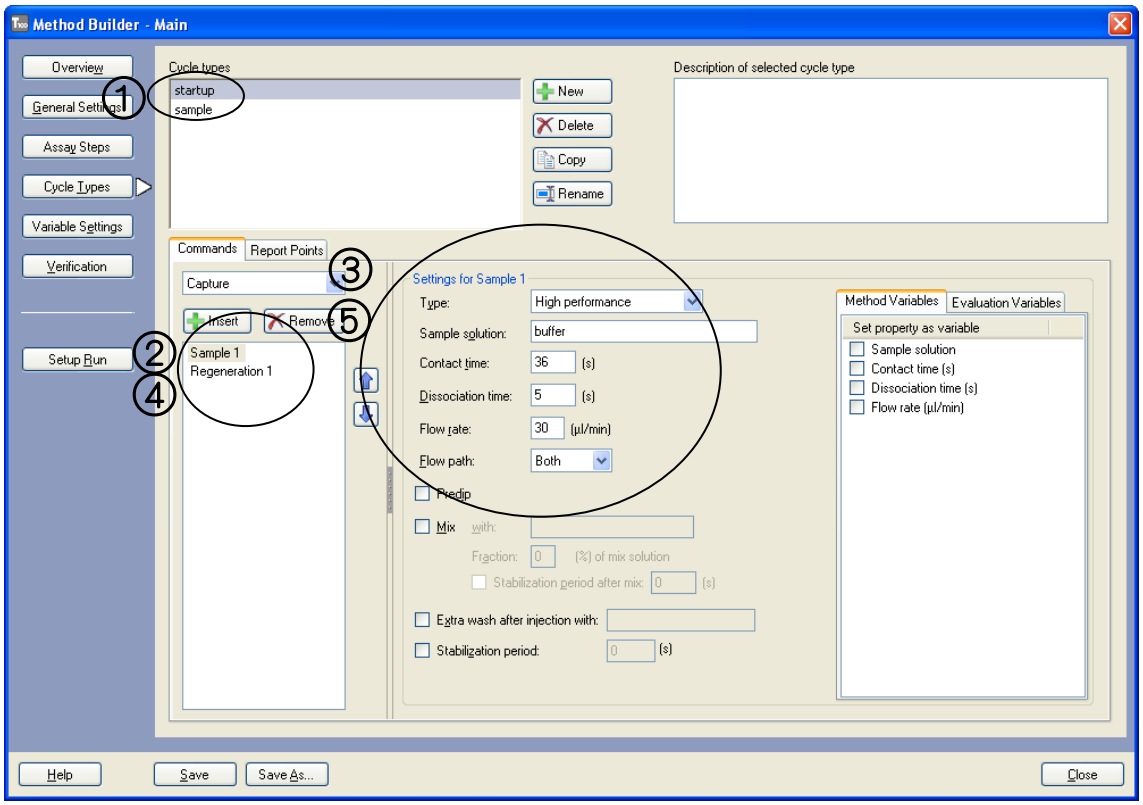
Recurrence　　○Distribute にチェックを入れ、occurrences evenly で 1 を選択。
全測定サイクル内で、均等にブランクの測定を実施する。

Number of replicates

times　　繰り返し測定回数を選択する。

↓

Cycle Types をクリックする。



① **Startup** をクリックする。アナライト測定前のスタートアップの詳細設定をおこなう。

② **Commands** タブの **Sample1** をクリックする。

③ Settings for Sample1 でスタートアップ用サンプル（Buffer）添加の詳細条件を設定する。測定流速以外は、サンプル添加と同一条件を設定する。

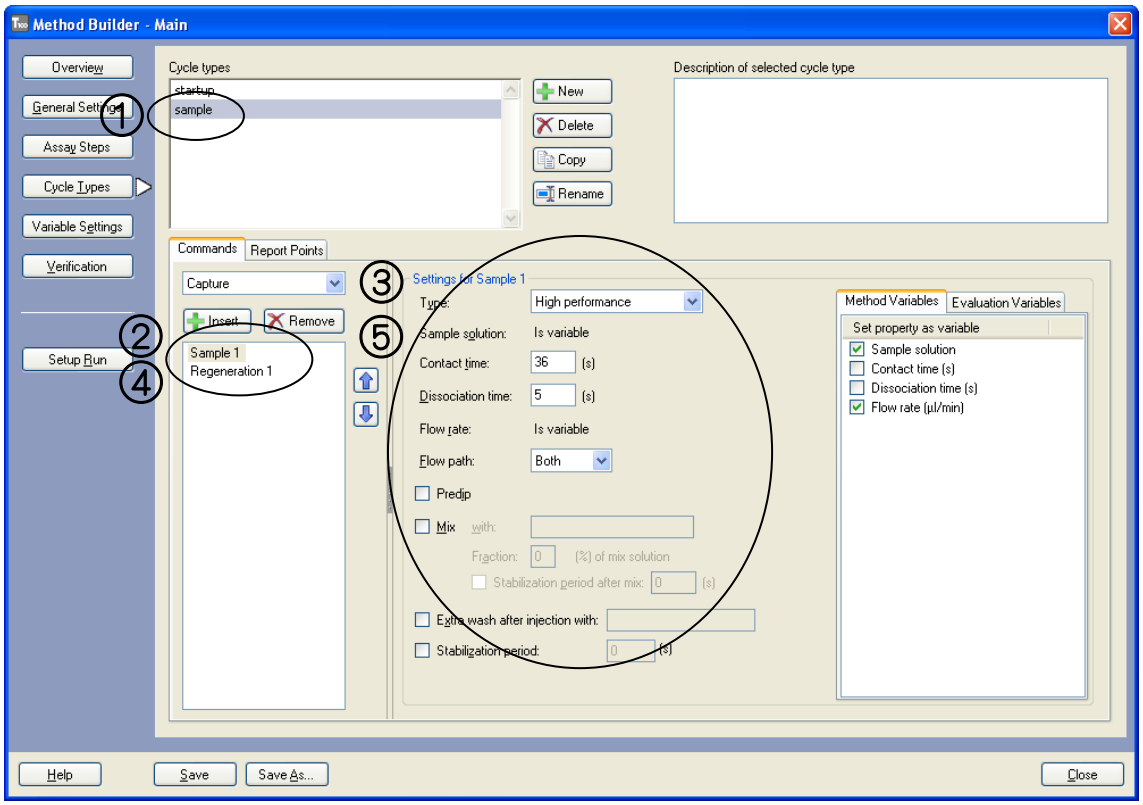
Type	**High performance** を選択する。
contact time	添加時間（s）。通常、36 秒程度。
Dissociation time	解離時間（s）。通常、5 秒程度。
Flow rate	流速（µl/min）。通常、30µl/min。
Flow path	Both を選択する。
Sample solution	Buffer　（ランニング緩衝液）

④ 引き続き、**Commands** タブの **Regeneration1** をクリックする。

⑤ 再生条件の設定をおこなう。

Regeneration solution	再生溶液名を入力する。
contact time	添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）。通常、30 µl/min。
Flow path	Both を選択する。

↓



① **Cycle types currently in Method** の **Sample** をクリックする。

② **Commands** タブの **Sample1** をクリックする。

③ Settings for Sample1 でサンプル添加の詳細条件を設定する。

Type	**High performance** を選択する。
contact time	添加時間（s）。通常、36 秒程度。
Dissociation time	解離時間（s）。通常、5 秒程度。
Flow rate	Is variable に設定されている。実数は、**Setup Run** の **Variables** で入力する。
Flow path	Both を選択する。

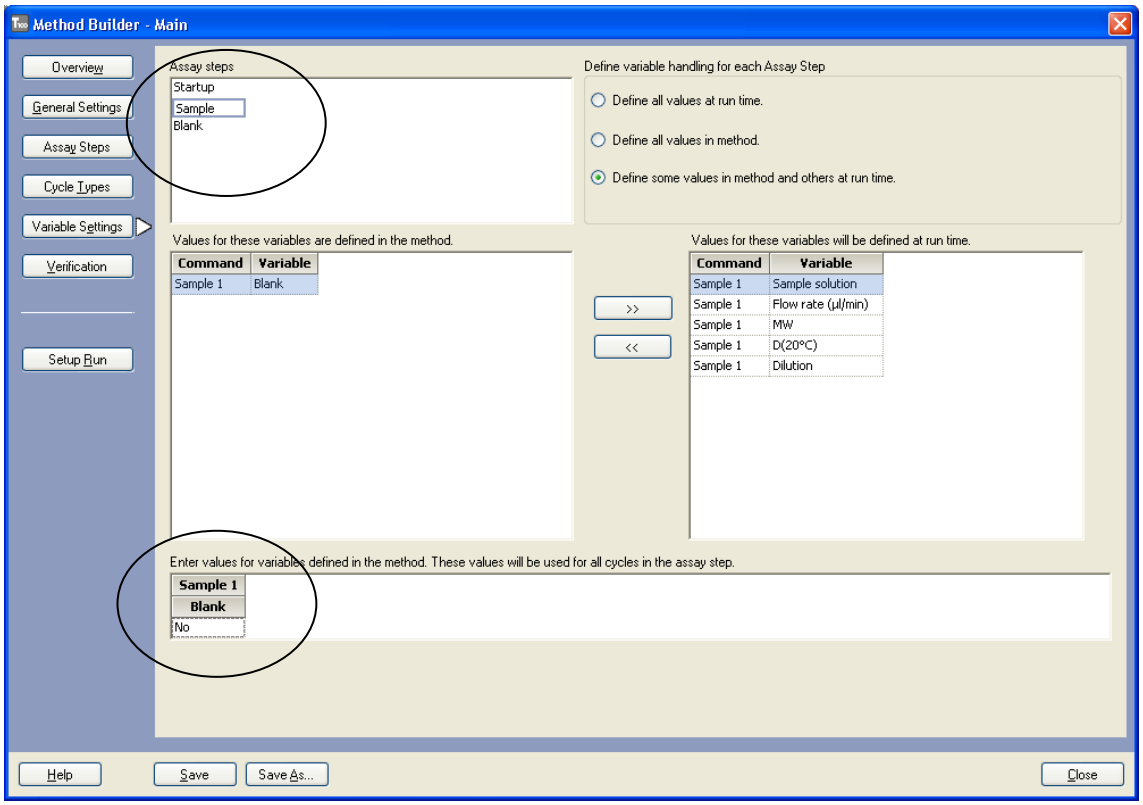
④ 引き続き、**Commands** タブの **Regeneration1** をクリックする。

⑤ 再生条件の設定をおこなう。

Regeneration solution	再生溶液名を入力する。
contact time	添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）。通常、30 µl/min。
Flow path	Both を選択する。

↓

Variable Settings を選択する。



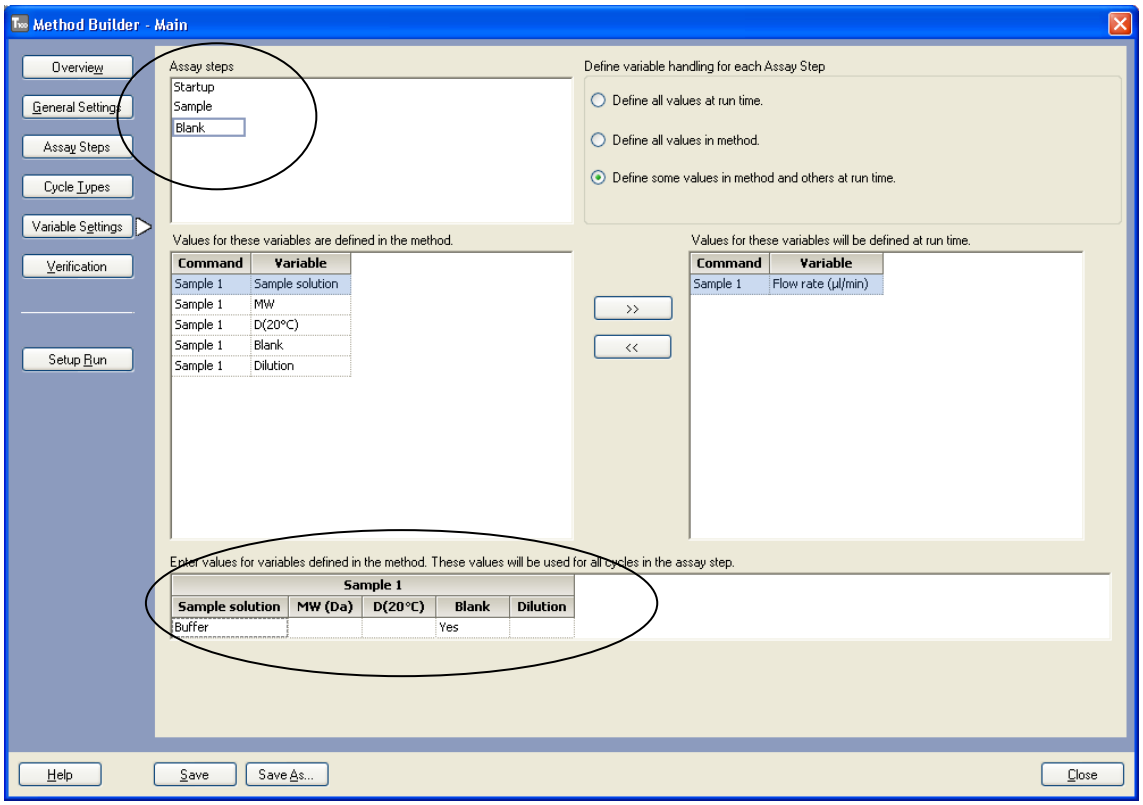
Assay Steps の **Sample** をクリックする。画面右上で、○ **Define some values in Method and others at run time.** にチェックを入れる。下記の 5 項目については、Setup Run 以降の Variables で入力する。

Sample solution	サンプル名
Flow rate （µl/min）	流速。同一サンプルで、5 µl/min と 100 µl/min の 2 流速を設定。
MW（Da）	分子量
D（20℃）	20℃における拡散係数
Dilution	サンプルの希釈倍率

以下について、画面下で設定する。

Blank	解析時のキーワードとして利用。ブランクサンプルか否かを指定する。サンプルの場合には、"No"または"n"を入力する。

↓



Assay Steps の **Blank** をクリックする。画面右上で、〇 **Define some values in Method and others at run time.** にチェックを入れる。**Flow rate （µl/min）**については、Setup Run 以降で入力する。

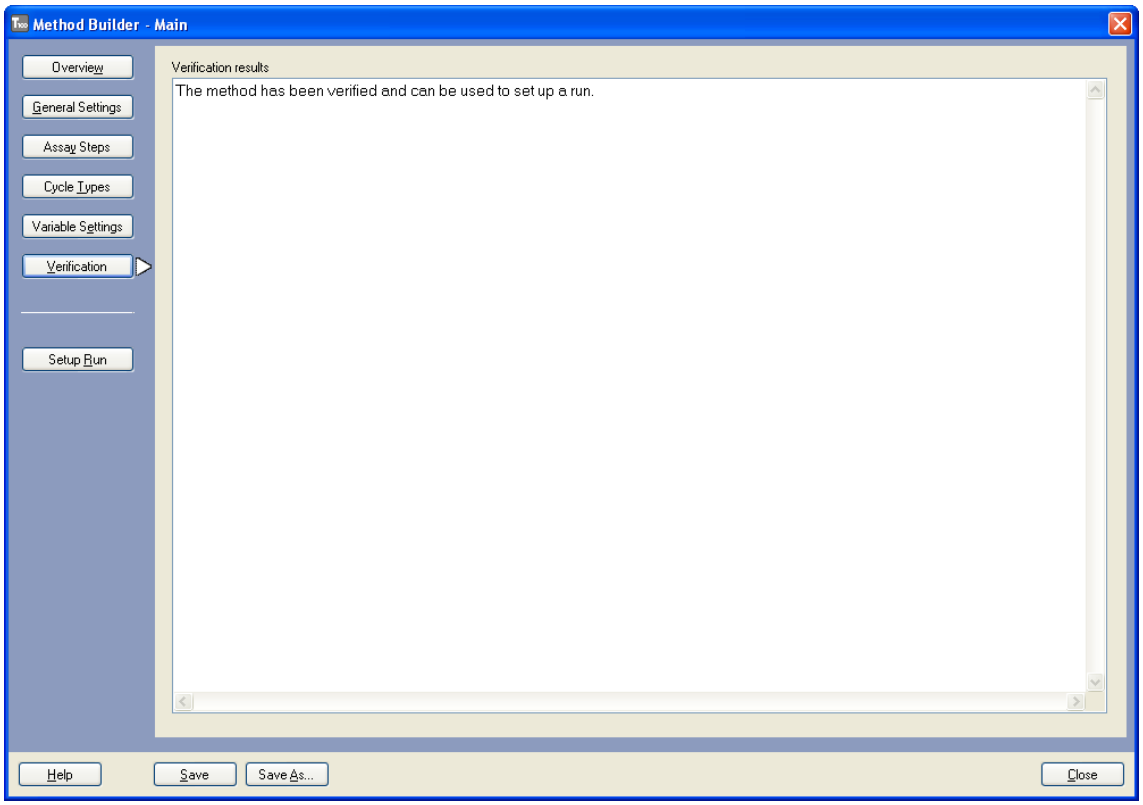
画面下で、下記の項目について入力する。

Sample solution	“Buffer”と入力。
MW（Da）	未入力
D（20℃）	未入力
Blank	ブランクサンプルの場合には、”Yes”または“y”を入力する。
Dilution	未入力

↓

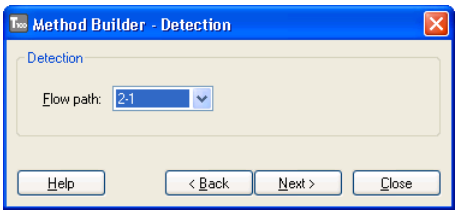
Verification をクリックする。

↓



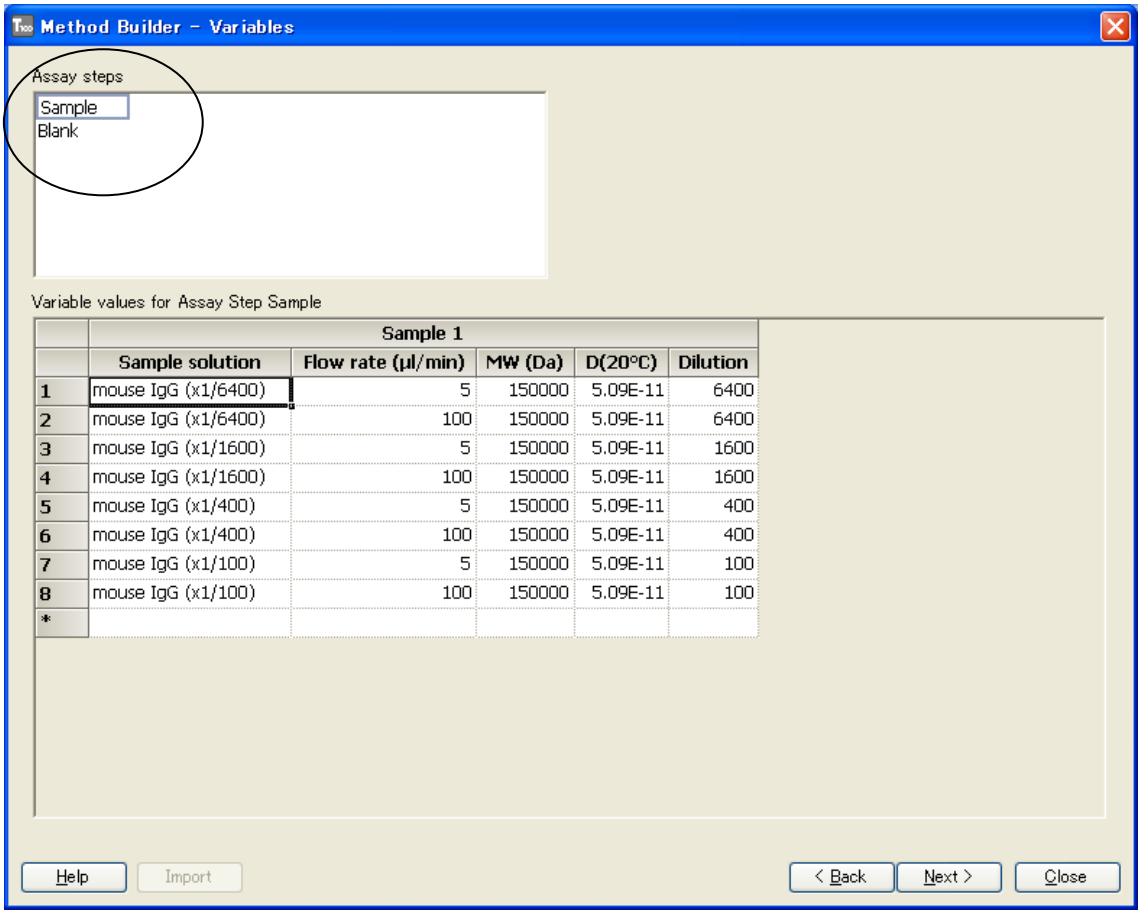
メソッドの設定に不備が無ければ“The Method has been verified and can be used to set up a run.”と表示される。問題が有る場合は該当部分が表示されるので、指示に従って修正する。確認後、Setup Run をクリックする。

↓



適切な Flow path を選択し、Next >をクリックする。

↓


Method Builder - Variables
Assay steps
Sample
Blank
Variable values for Assay Step Sample
Sample 1
Sample solution
Flow rate (µl/min)
MW (Da)
D(20°C)
Dilution
1 mouse IgG (x1/6400) 5 150000 5.09E-11 6400
2 mouse IgG (x1/6400) 100 150000 5.09E-11 6400
3 mouse IgG (x1/1600) 5 150000 5.09E-11 1600
4 mouse IgG (x1/1600) 100 150000 5.09E-11 1600
5 mouse IgG (x1/400) 5 150000 5.09E-11 400
6 mouse IgG (x1/400) 100 150000 5.09E-11 400
7 mouse IgG (x1/100) 5 150000 5.09E-11 100
8 mouse IgG (x1/100) 100 150000 5.09E-11 100
*
Help
Import
< Back
Next >
Close

Sample をクリックする。下記項目について入力する。

Sample solution　　サンプル名

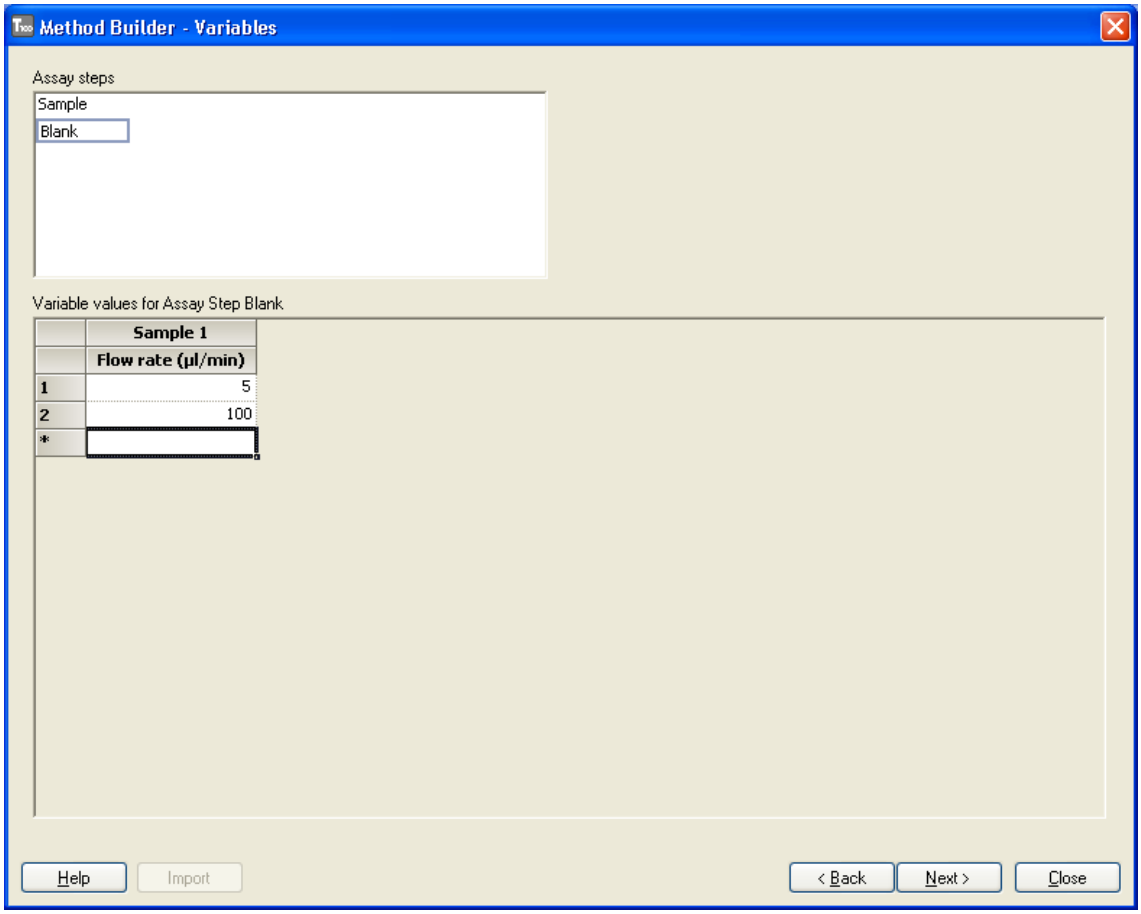
Flow rate　(µl/min)　　流速。同一サンプルで、5 µl/min と 100 µl/min の 2 流速を設定。

Mw（Da）　　分子量

D（20℃）　　20℃における拡散係数

Dilution　　サンプルの希釈倍率

↓



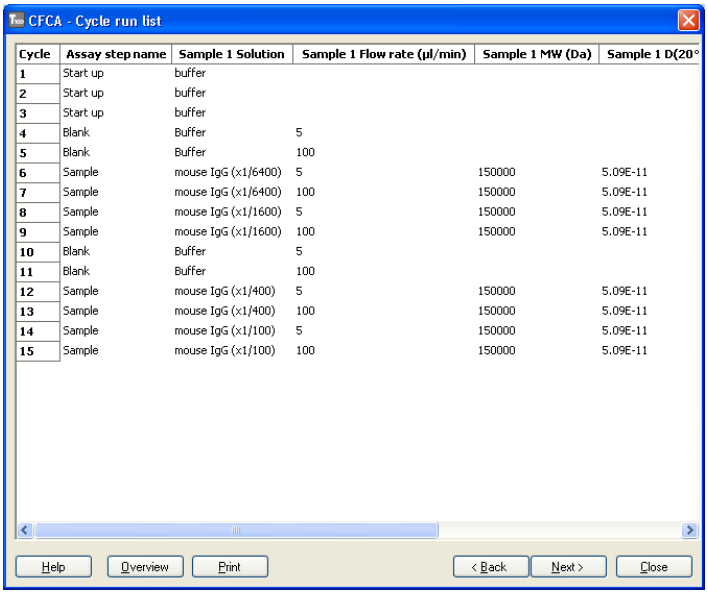
引き続き、**Blank** をクリックする。

Flow rate （µl/min）　　流速。Sample と同一の流速を設定する。

設定後、**Next >**をクリックする。

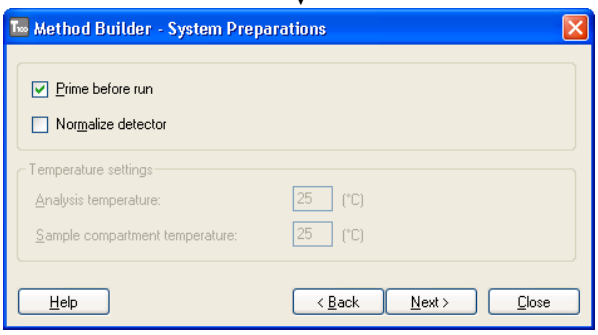
↓

測定サイクルリストが表示される。


CFCA - Cycle run list
Cycle | Assay step name | Sample 1 Solution | Sample 1 Flow rate (µl/min) | Sample 1 MW (Da) | Sample 1 D(20°
1 Start up buffer
2 Start up buffer
3 Start up buffer
4 Blank Buffer 5
5 Blank Buffer 100
6 Sample mouse IgG (x1/6400) 5 150000 5.09E-11
7 Sample mouse IgG (x1/6400) 100 150000 5.09E-11
8 Sample mouse IgG (x1/1600) 5 150000 5.09E-11
9 Sample mouse IgG (x1/1600) 100 150000 5.09E-11
10 Blank Buffer 5
11 Blank Buffer 100
12 Sample mouse IgG (x1/400) 5 150000 5.09E-11
13 Sample mouse IgG (x1/400) 100 150000 5.09E-11
14 Sample mouse IgG (x1/100) 5 150000 5.09E-11
15 Sample mouse IgG (x1/100) 100 150000 5.09E-11
Help
Overview
Print
< Back
Next >
Close

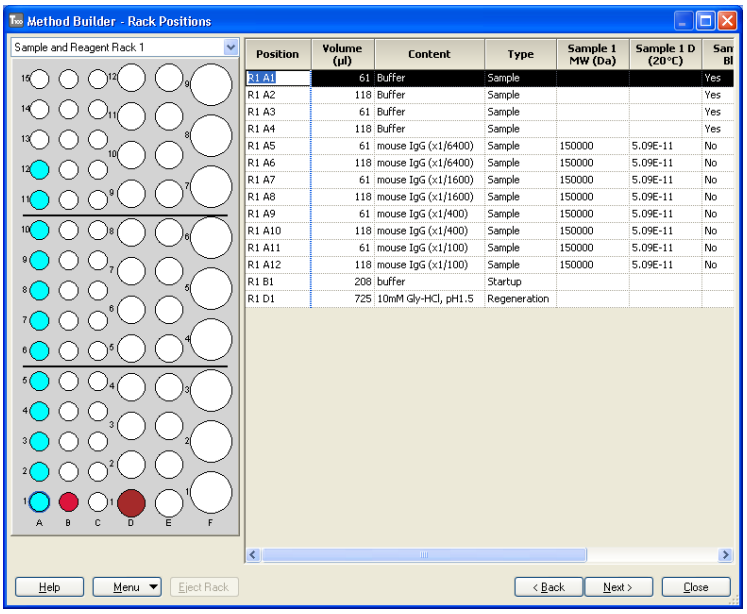
Next >をクリックする。

↓



測定を始める前に、**Prime** および **Normalize** をおこなう場合にはチェックを入れる。
入力後、**Next >**をクリックする。

↓



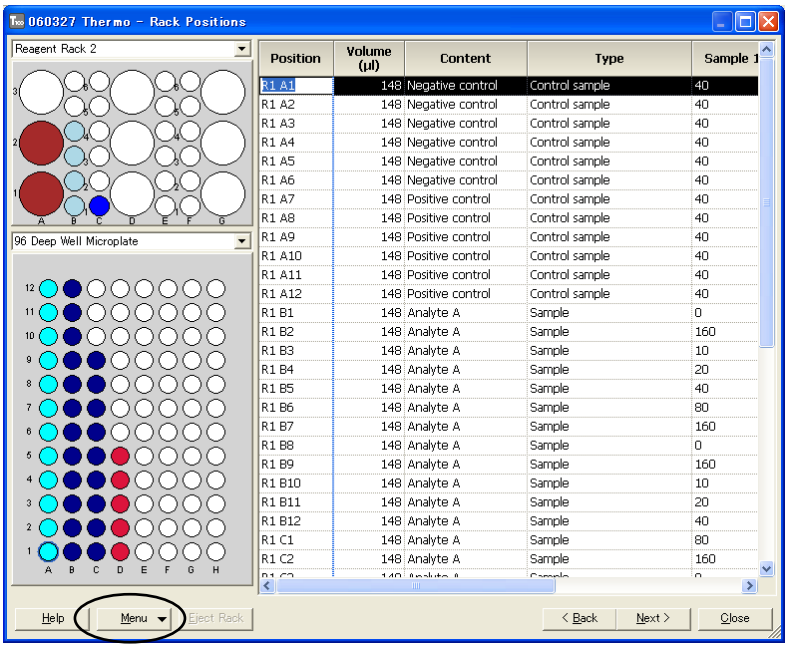
右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-42. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu → Export Positions...** を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu → Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

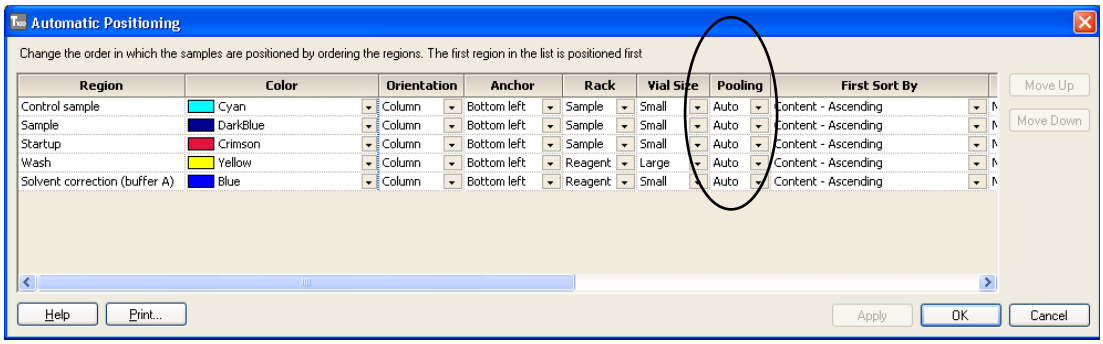
補足 5-43. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu から Automatic Positioning...を選ぶ。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定をおこなうことができる。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっている。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックする。

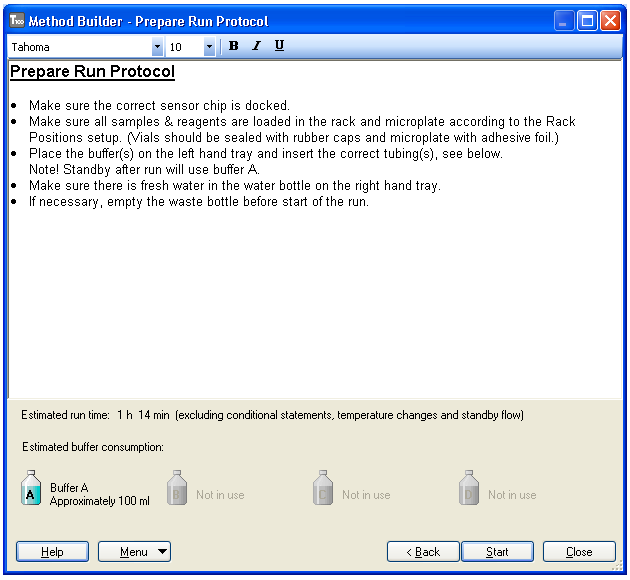
なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。**Eject Rack Tray** ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックする。

↓

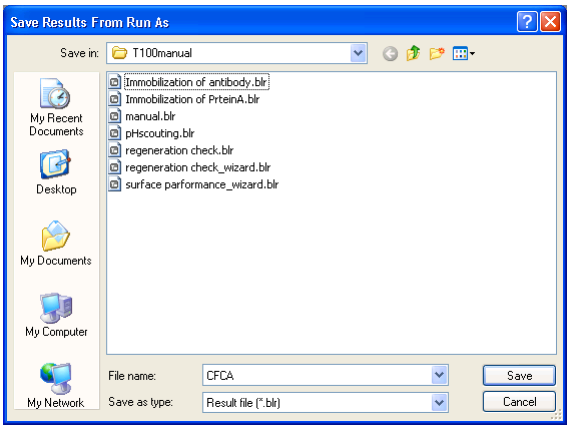

Method Builder - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 1 h 14 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Buffer A
Approximately 100 ml
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示される。
Start をクリックする。

↓

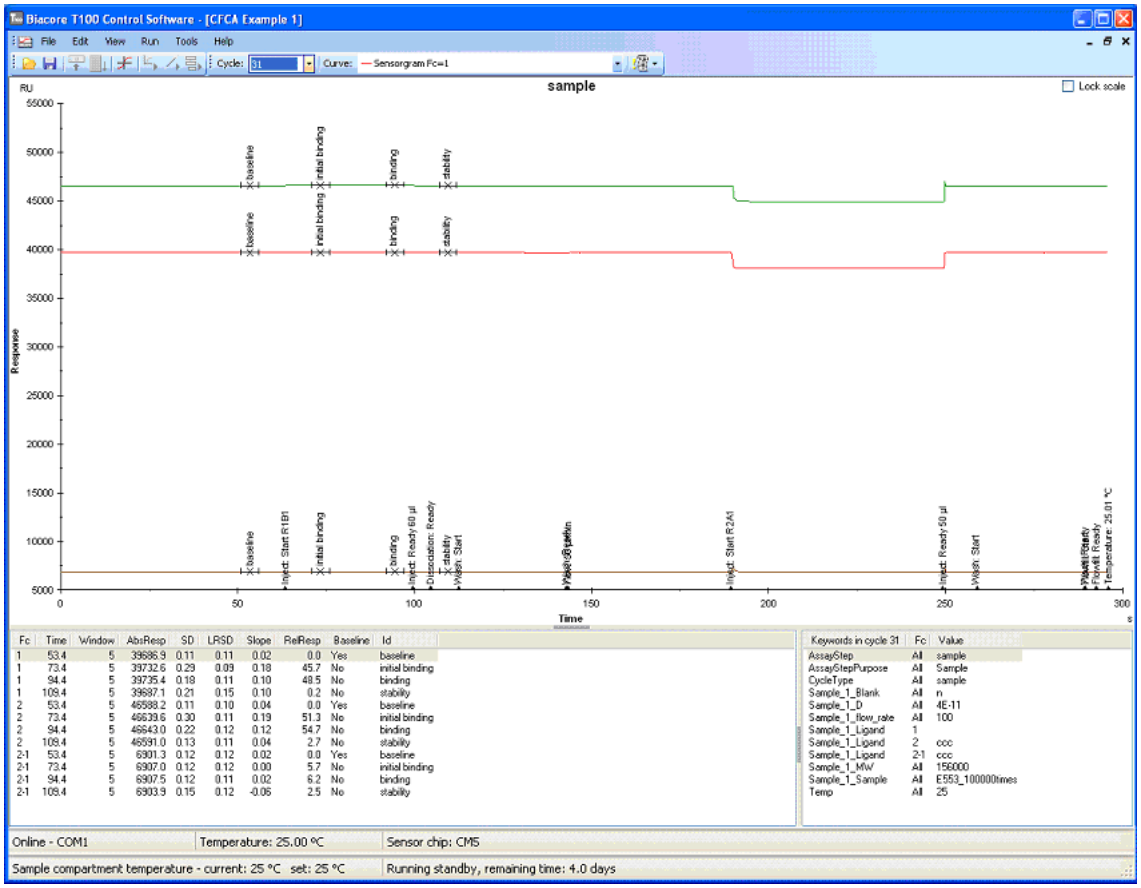
設定したメソッドをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓


Biacore T100 Control Software - [CFCA Example 1]
File Edit View Run Tools Help
Cycle: 31
Curve: Sensorgram Fc=1
sample
Lock scale
RU
Response
Time
baseline
initial binding
binding
stability
Inject: Start R1B1
Inject: Ready/60 µl
Dissociation: Ready
Wash: Start
Inject: Start R2A1
Inject: Ready/50 µl
Wash: Start
Fc Time Window AbsResp SD LRSD Slope RelResp Baseline Id
1 53.4 5 39686.9 0.11 0.11 0.02 0.0 Yes baseline
1 73.4 5 39732.6 0.29 0.09 0.18 45.7 No initial binding
1 94.4 5 39735.4 0.18 0.11 0.10 48.5 No binding
1 109.4 5 39687.1 0.21 0.15 0.10 0.2 No stability
2 53.4 5 46588.2 0.11 0.10 0.04 0.0 Yes baseline
2 73.4 5 46639.6 0.30 0.11 0.19 51.3 No initial binding
2 94.4 5 46643.0 0.22 0.12 0.12 54.7 No binding
2 109.4 5 46591.0 0.13 0.11 0.04 2.7 No stability
2-1 53.4 5 6901.3 0.12 0.12 0.02 0.0 Yes baseline
2-1 73.4 5 6907.0 0.12 0.12 0.00 5.7 No initial binding
2-1 94.4 5 6907.5 0.12 0.11 0.02 6.2 No binding
2-1 109.4 5 6903.9 0.15 0.12 -0.06 2.5 No stability
Keywords in cycle 31 Fc Value
AssayStep All sample
AssayStepPurpose All Sample
CycleType All sample
Sample_1_Blank All n
Sample_1_D All 4E-11
Sample_1_flow_rate All 100
Sample_1_Ligand 1
Sample_1_Ligand 2 ccc
Sample_1_Ligand 2-1 ccc
Sample_1_MW All 156000
Sample_1_Sample All E553_100000times
Temp All 25
Online - COM1
Temperature: 25.00 °C
Sensor chip: CM5
Sample compartment temperature - current: 25 °C set: 25 °C
Running standby, remaining time: 4.0 days

↓

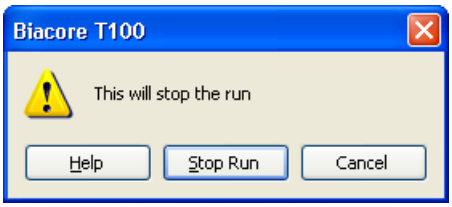
終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示される。

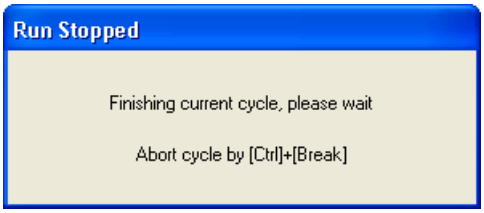
補足 5-44. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。



ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

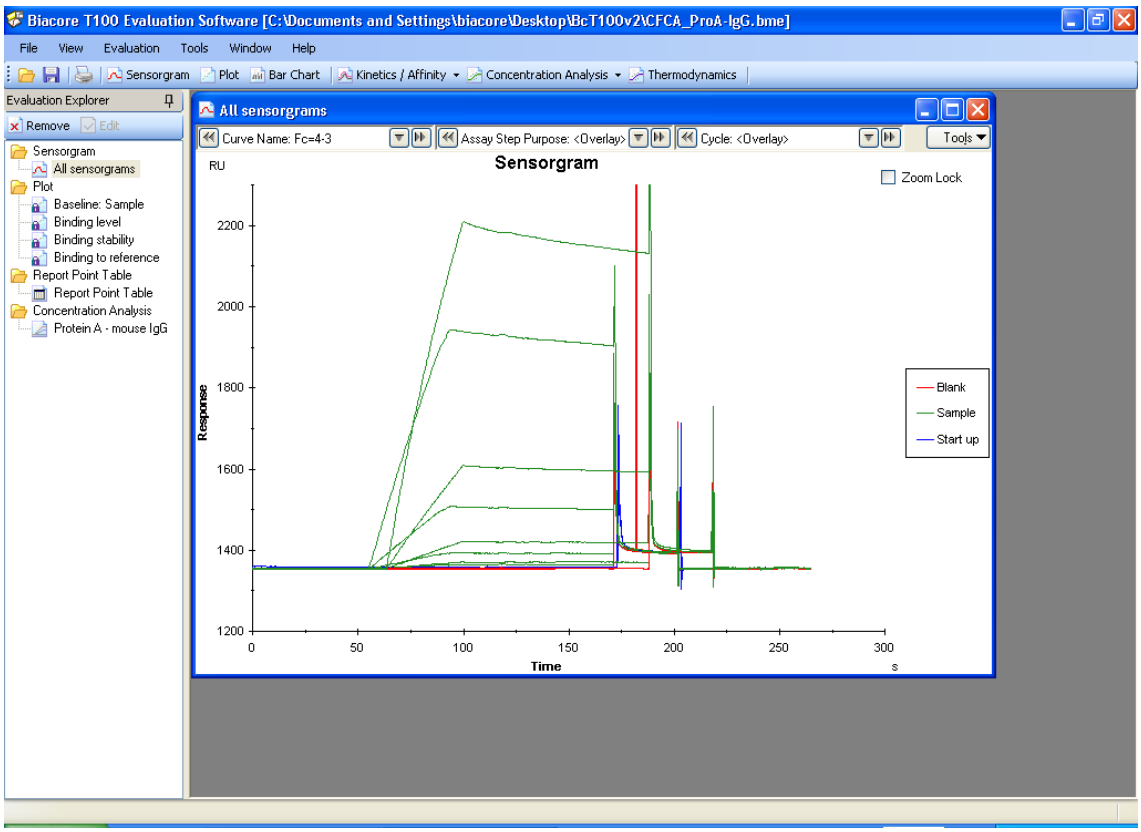
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

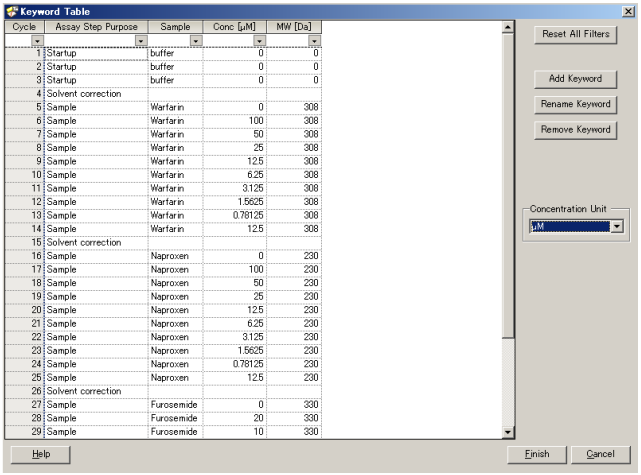
5-4-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。

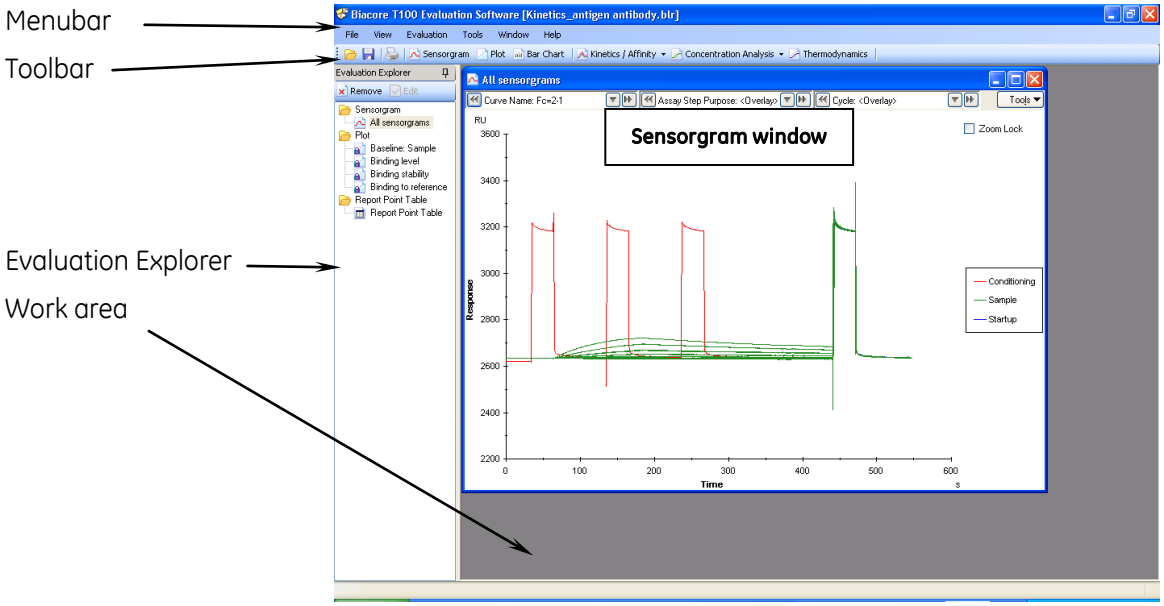


補足 5-45. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table...**で変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。

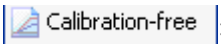


補足 5-46. 画面の説明



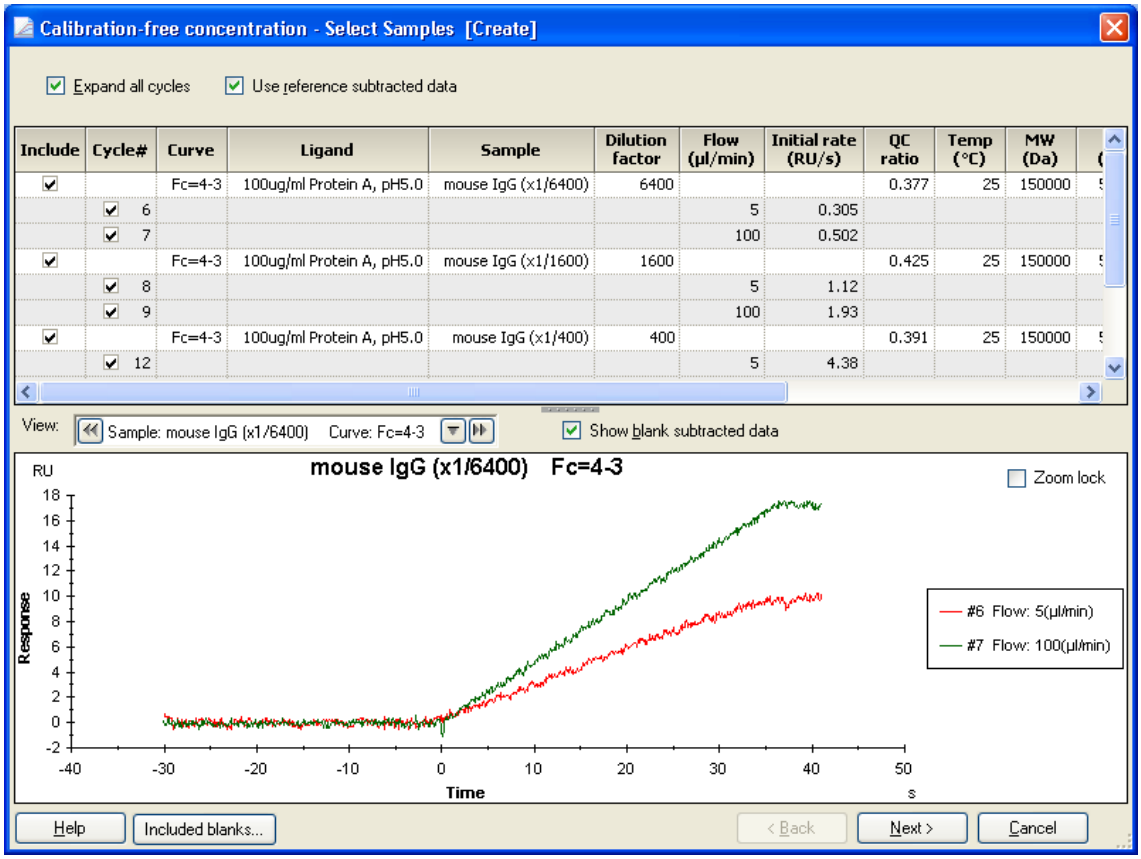
Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の

をクリックし、 

をクリックする。

↓



画面上の表に、測定したサンプル情報が、測定サイクル順に表示される。

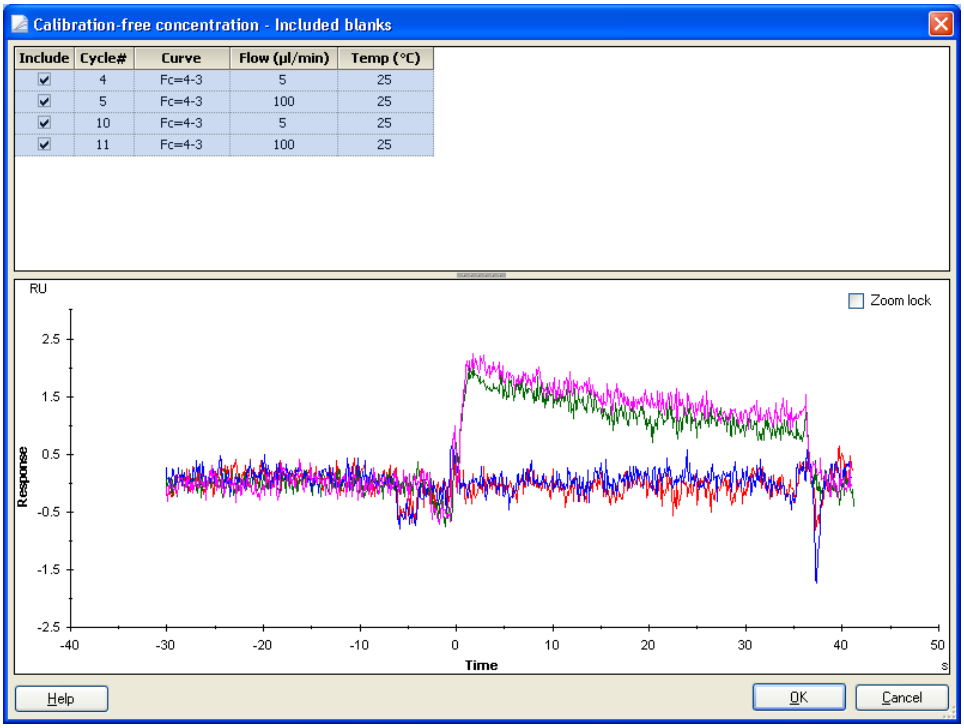
Cycle#	測定サイクル番号
Curve	カーブタイプ
Ligand	リガンド名
Sample	アナライト名
Dilution factor	希釈倍率
Flow （µl/min）	測定流速
Initial rate （RU/s）	添加開始 10 秒後の、5 秒幅における結合速度。（自動計算される。）
QC ratio	QC 比（自動計算される。）
Temp （℃）	測定温度
MW （Da）	分子量
D （m^2/s）	測定温度における拡散係数。（自動計算される。）
Blank used	ブランクとして利用しているセンサーグラムのサイクル番号

なお、画面上部の **Expand all cycles** のチェックを外すと、サンプル情報表の表示がサンプル

名別のリストに変更する。 リファレンスセルを差し引かないセンサーグラムで解析をおこなう場合には、**Use reference subtraction data** のチェックを外す。

↓

画面左下の、Included blanks... をクリックして、ブランクの確認をおこなう。



センサーグラムを確認して、エアーの混入や形状がおかしいブランクは、画面上表の **Include** のチェックを外す。ブランクセルの差し引きをおこなわなくても解析は可能である。ブランクを利用しない場合には、**Include** のすべてのチェックを外す。
選択後、**OK** をクリックする。

↓

解析に利用できるセンサーグラムの選択をおこなう。評価基準は、補足 5-47 を参照する。

補足 5-47. CFCA に利用するセンサーグラムの選択基準

CFCA では、マストランスポートリミテーション条件下のセンサーグラムを解析に利用する。以下の評価基準を満たすセンサーグラムを解析に利用する。

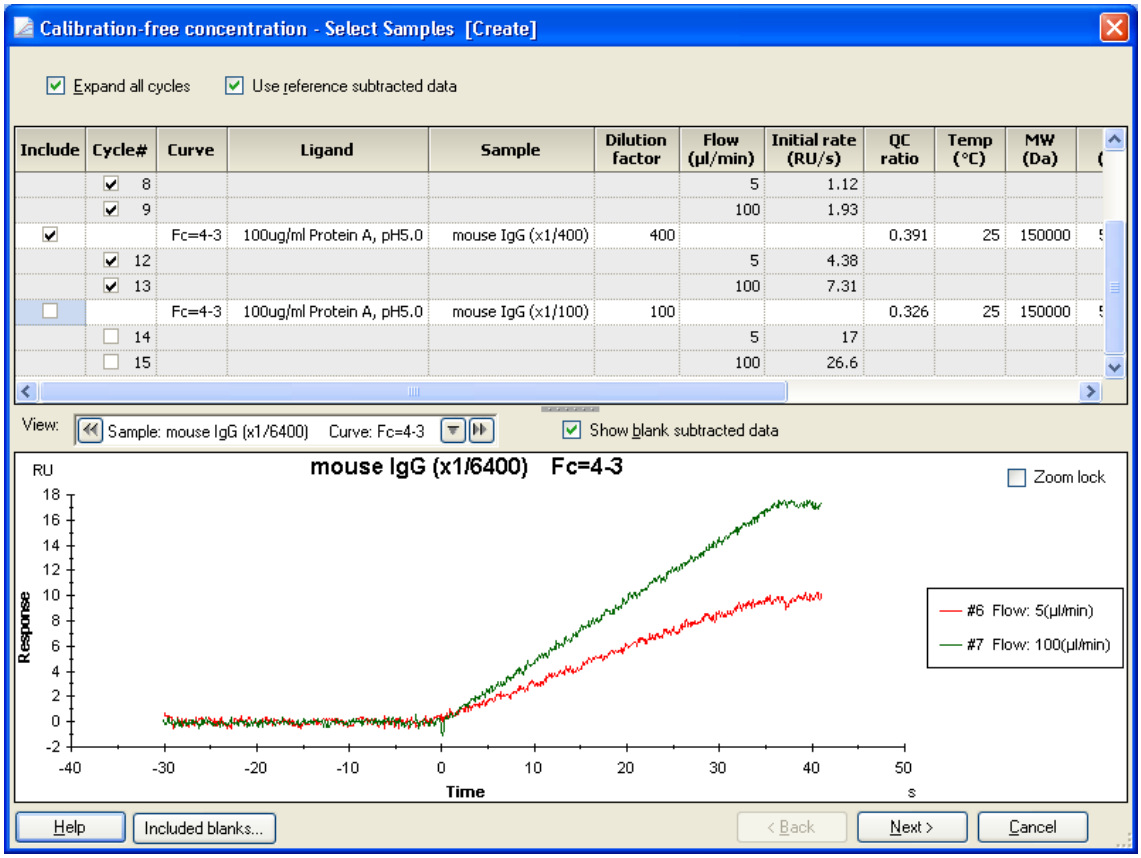
① **低流速の初期速度**（Initial rate （ RU / s ） ）= 0.3～15 （ RU / s ）

＜ 0.3 RU / s では、レスポンスの上昇量が低いため良好な結果が得られない。

＞ 15 RU / s では、マストランスポートリミテーションが十分ではない危険性がある。

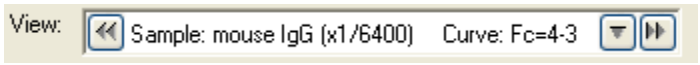
② **QC ratio ≧ 0.13**

＜ 0.13 の場合には、マストランスポートリミテーションが十分ではない。



解析に利用しないセンサーグラムは、**Include** のチェックを外す。

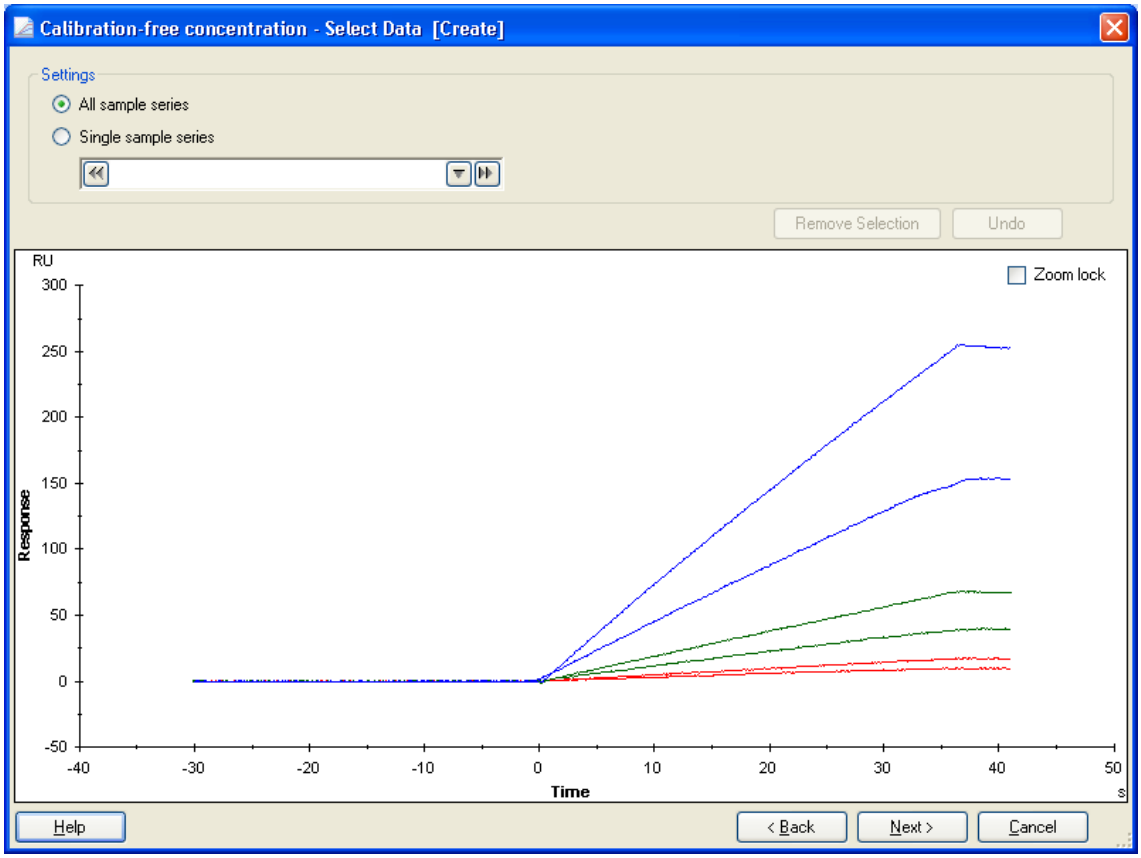
選択したセンサーグラムを確認したい場合には、画面中央の



で選択する。▼をクリックしてセンサーグラムを選択する。**Show blank subtracted data** のチェックを外すと、リファレンスセルと差し引き前のセンサーグラムを確認できる。

Next >をクリックする。

↓



選択したセンサーグラムの重ね書きが表示される。

Settings の○ **Single Sample series** にチェックを入れ、

の▼をクリックしてサンプルを選択すると、各サンプルのセンサーグラムの重ね書きに変更できる。

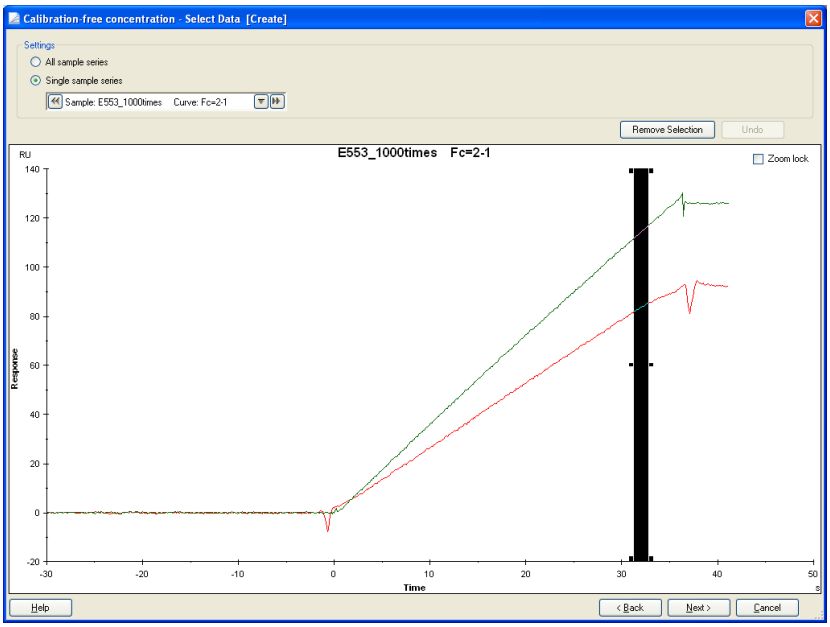
解析は、サンプル添加開始 3 秒後から、添加終了 3 秒前の範囲でおこなう。この範囲にエアーの混入などによるノイズが確認できる場合には、該当部位を削除する。補足 5-48 を参照。

Next >をクリックする。

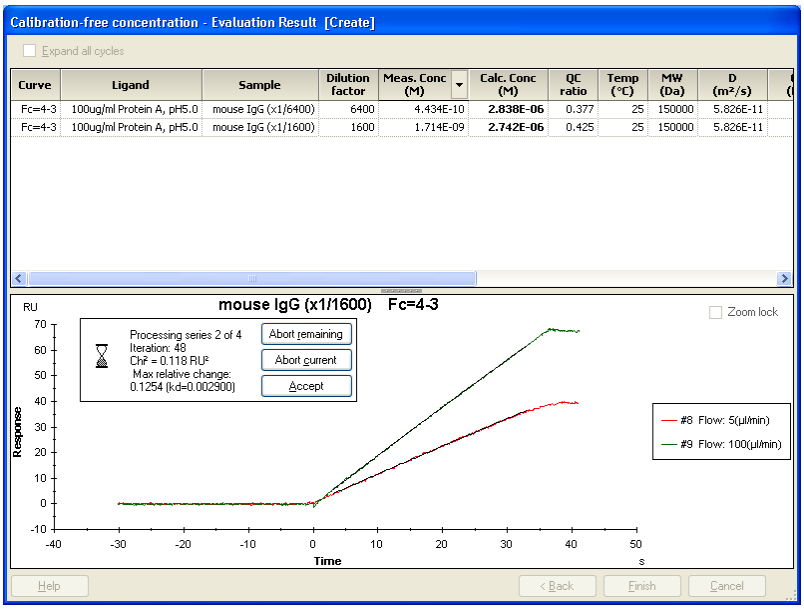
↓

補足 5-48. センサーグラムの部分的削除

エアーの混入などで、センサーグラムが乱れている部分は、以下の方法で削除する。
マウスの右ボタンをドラッグし、該当の領域を拡大した後、マウスの左ボタンをドラッグして削除する領域を選択する。拡大図を解除する場合は、白い部分をダブルクリックすると、一つ前の縮小画面に戻る。

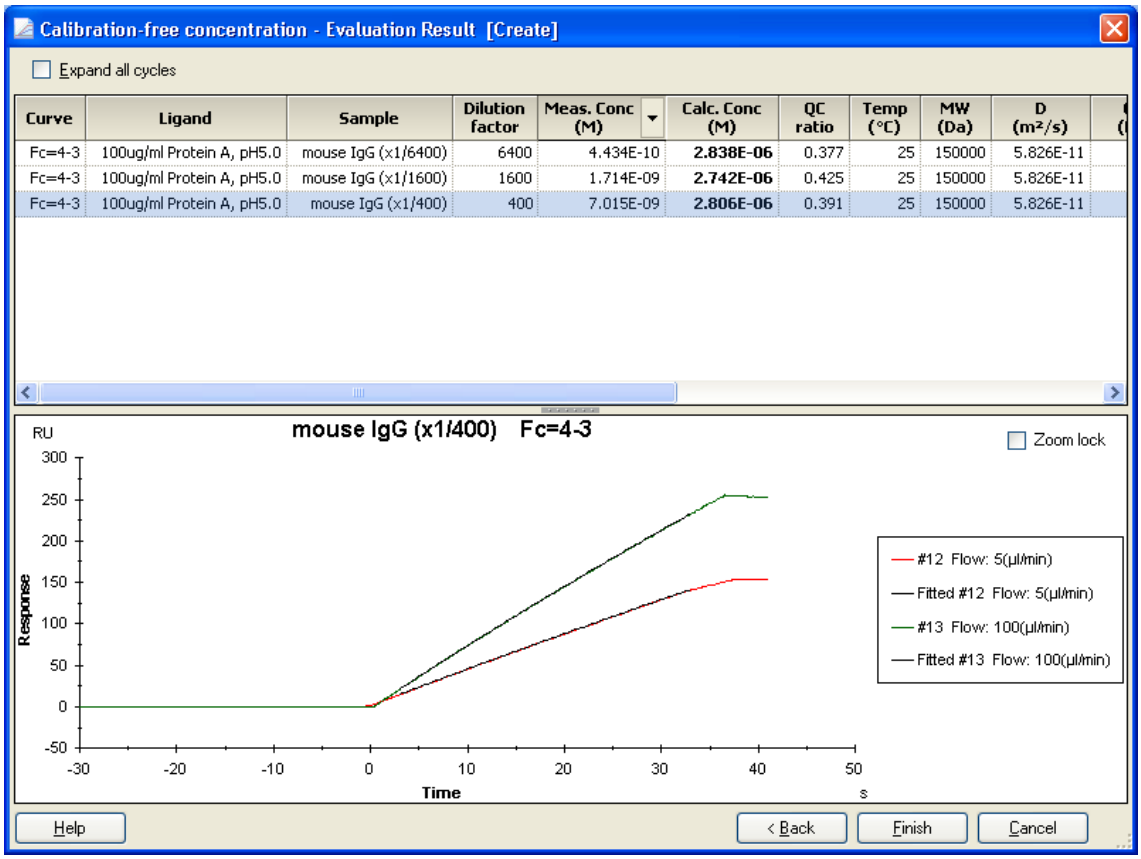


領域をクリックすると、グラフ右上の **Remove Selection** ボタンがアクティブになる。クリックすると、選択部位が削除される。**Undo** をクリックすると、削除前に戻る。



解析が開始する。

↓


Calibration-free concentration - Evaluation Result [Create]
Expand all cycles
Curve | Ligand | Sample | Dilution factor | Meas. Conc (M) | Calc. Conc (M) | QC ratio | Temp (°C) | MW (Da) | D (m²/s)
Fc=4-3 | 100ug/ml Protein A, pH5.0 | mouse IgG (x1/6400) | 6400 | 4.434E-10 | 2.838E-06 | 0.377 | 25 | 150000 | 5.826E-11
Fc=4-3 | 100ug/ml Protein A, pH5.0 | mouse IgG (x1/1600) | 1600 | 1.714E-09 | 2.742E-06 | 0.425 | 25 | 150000 | 5.826E-11
Fc=4-3 | 100ug/ml Protein A, pH5.0 | mouse IgG (x1/400) | 400 | 7.015E-09 | 2.806E-06 | 0.391 | 25 | 150000 | 5.826E-11
mouse IgG (x1/400) Fc=4-3
RU
Response
Time
s
Zoom lock
#12 Flow: 5(µl/min)
Fitted #12 Flow: 5(µl/min)
#13 Flow: 100(µl/min)
Fitted #13 Flow: 100(µl/min)
Help
< Back
Finish
Cancel

解析が終了すると、画面上部に各サンプルの結果が表示される。

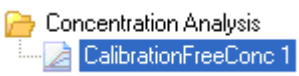
Meas.Conc （ M ）	解析によって算出された濃度。▼をクリックすると単位変更が可能。
Calc.Conc （ M ）	希釈倍率を Meas.Conc に掛けた濃度。
QC ratio	QC 比
Chi² （ RU² ）	カイ二乗
SE （ Meas.Conc ）	Meas.Conc の標準誤差

解析結果の評価については、補足 5-49 を参照。

Finish をクリックする。

↓

上記解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存される。



補足 5-49. CFCA の解析結果の評価

以下の基準を満たしている場合には、良好な結果と判断できる。

① **カーブフィッティングが良好である**

フィッティングが良好な場合、カーブフィッティングによって得られた黒色のセンサーグラムが、測定センサーグラムと一致する。Chi^2 値が、低流速のセンサーグラムの解離直前の結合量の 5%以下であれば、フィッティングが良好と判断できる。

② **SE （standard error） が解析結果濃度の 10%以下**

SE が算出濃度の 10%以下であれば問題ない。

③ **解析結果濃度が、0.05～5 µg/ml の範囲内である**

範囲外の場合には、①、②の基準にパスしていても結果の取り扱いに注意が必要である。

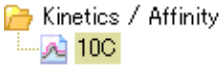
補足 5-50. ファイル名の変更

Evaluation Explorer 中の目的ファイルをクリックする。

↓

上記状態で、キーボードの Backspace キーで、ファイル名を一度削除し、新たに新規ファイル名を入力する。

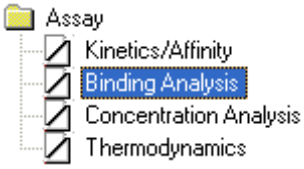
↓



5-5. 結合の有無の確認、スクリーニング

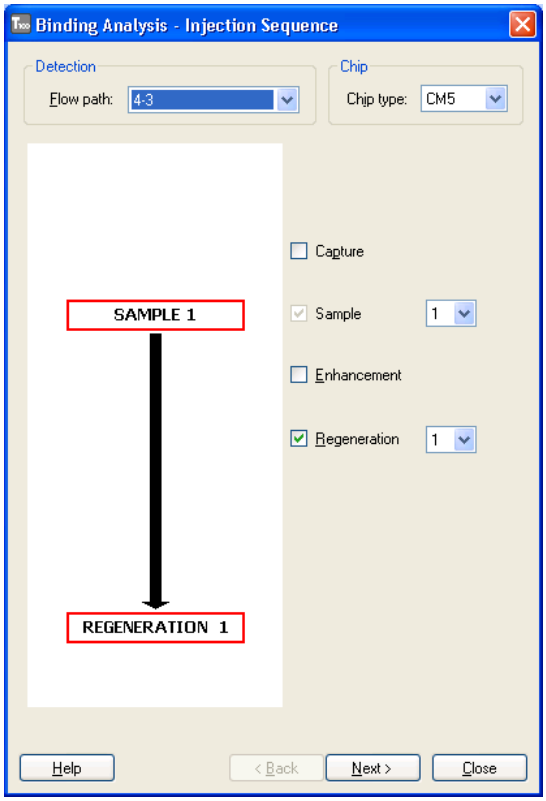
5-5-1. プログラムの実行

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。



Assay → **Binding Analysis** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。なお、低分子化合物のスクリーニングを実施する場合には、テンプレートのメソッドを利用すること。6 章を参照。

↓



1 サイクル分の測定シークエンスを設定する。

Detection

Flow path　測定をおこなうフローセルを設定する。
リファレンスの差し引き機能を利用する。キャプチャー法を利用する場合、差し引き機能として 2-1 または 4-3 のみの選択となる。

Chip

Chip type　利用するセンサーチップを選択する。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドをトラップする場合にチェックを入れる。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされる。

Sample

アナライトの添加。複数サンプルの添加は、補足 5-40 を参照。

Enhancement

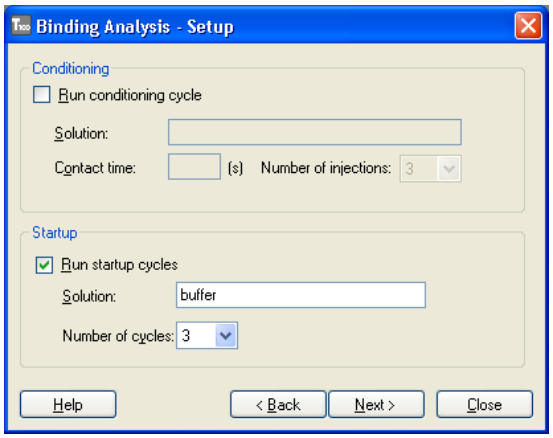
2 次抗体などを添加する場合にチェックを入れる。

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れる。添加回数 1 回または 2 回。

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



アナライト測定前のベースライン安定化のためのコンディショニングと、ダミーランサイクルの設定をおこなう。

Conditioning

Solution　再生溶液または緩衝液の名称

contact time　添加時間（s）

Number of injections　添加回数

Startup

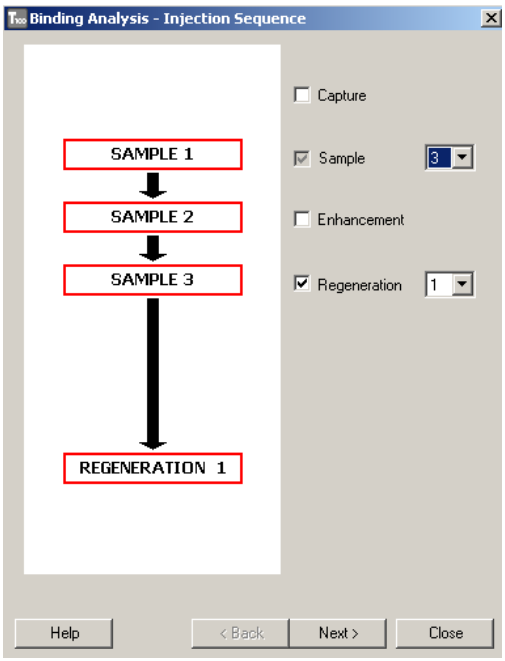
Solution	指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施する。通常は、ランニング緩衝液を用いる。
Number of cycles	サイクル数。3 回以上を推奨する。

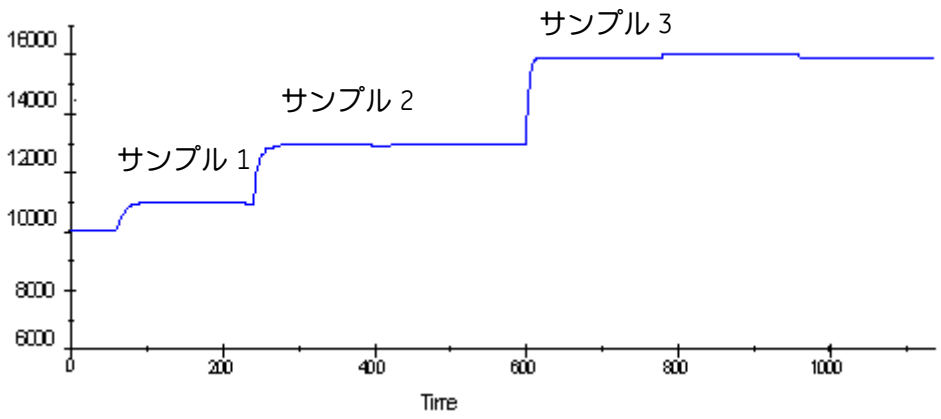
Next >をクリックする。

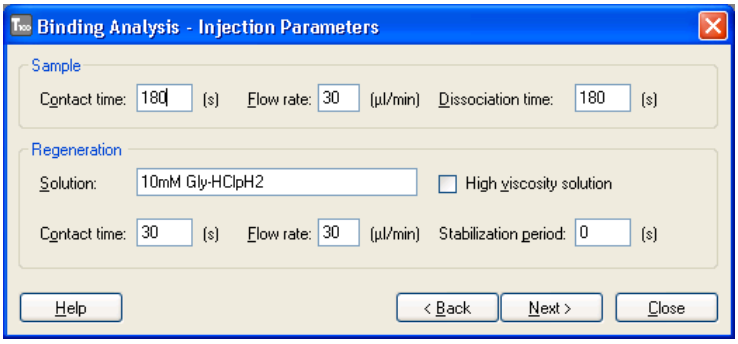
↓

補足 5-51. 複数サンプルの連続添加

エピトープマッピング等多段階の相互作用を検証する場合は、**Sample** 右のカラムで添加サンプル数を選択する。最大 4 サンプルまでの添加が可能である。







Sample

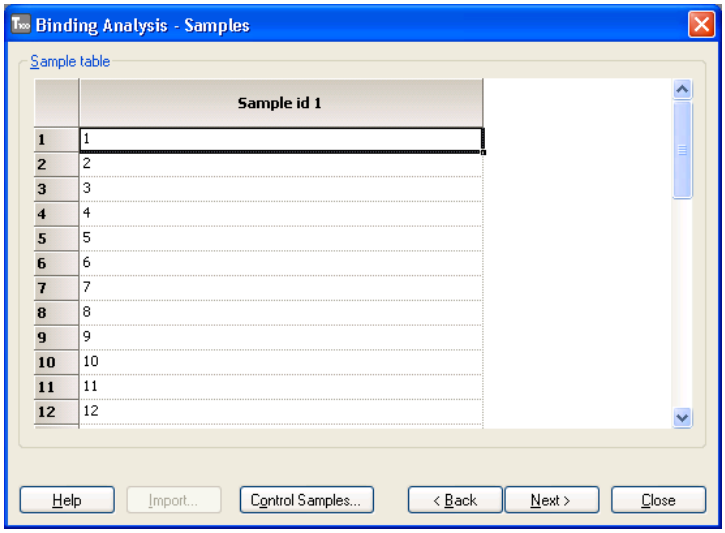
contact time	アナライトの添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Dissociation time	解離時間（s）

Regeneration

Solution	再生溶液の名称
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40% エチレングリコール以上）の場合は選択する
contact time	再生溶液の添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Stabilization period	添加後のベースラインの安定化時間（s）

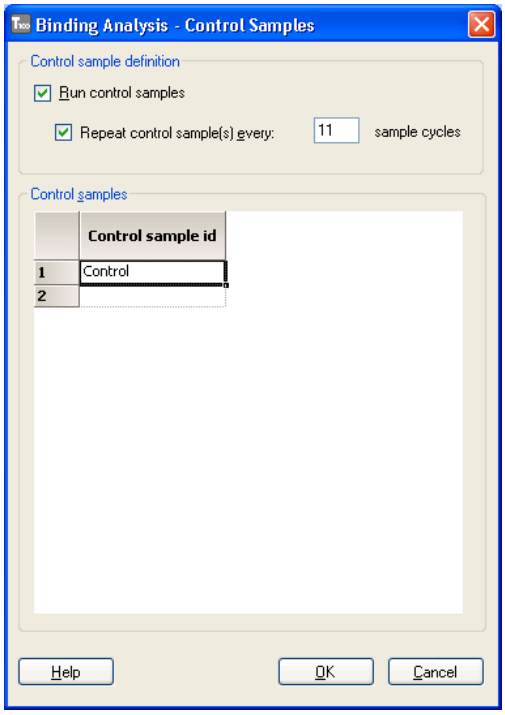
設定後、**Next >**をクリックする。

↓



Sample id	アナライトの名称。入力した順番で測定する。

コントロールサンプルを定期的に添加する場合は、**Control Samples...**をクリックする。



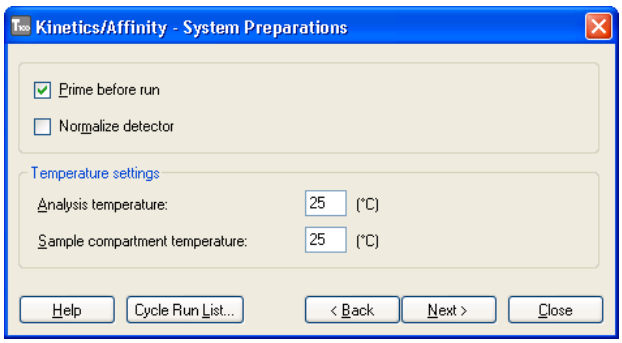
Repeat Control Sample(s) every　何サンプル毎にコントロールサンプルを測定するか入力する。入力後、**OK** をクリックする。

入力後、**Next >**をクリックする。

補足 5-52. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

↓

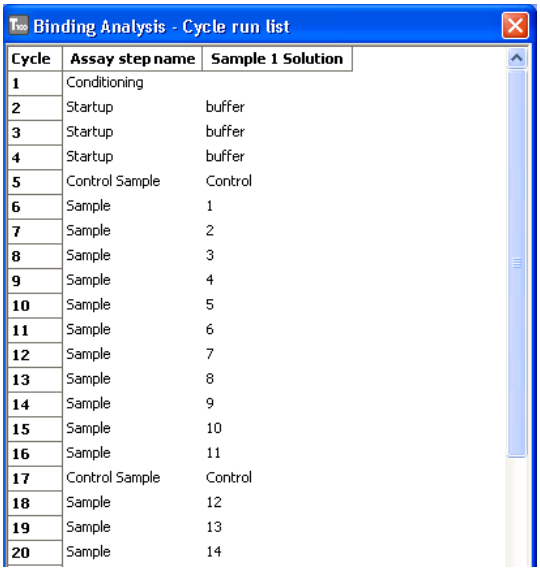


測定を始める前の **Prime** および **Normalize** の実施を選択する。

Analysis temperature　25 ℃

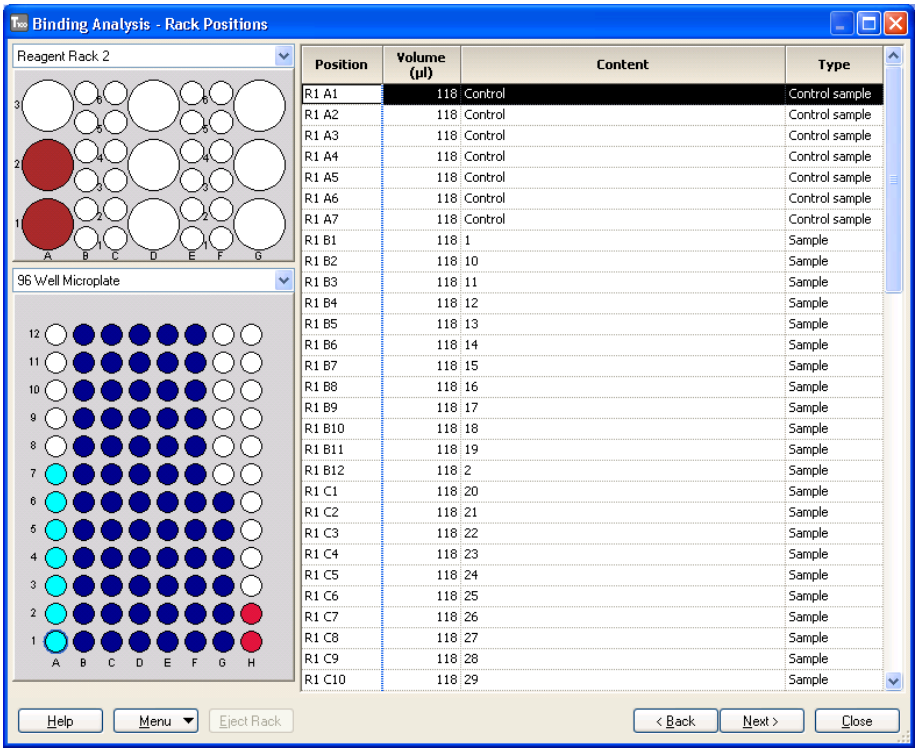
Sample compartment temperature　25 ℃

サイクルの測定順番を確認したい場合には、**Cycle Run List...**をクリックする。



Next >をクリックする。

↓



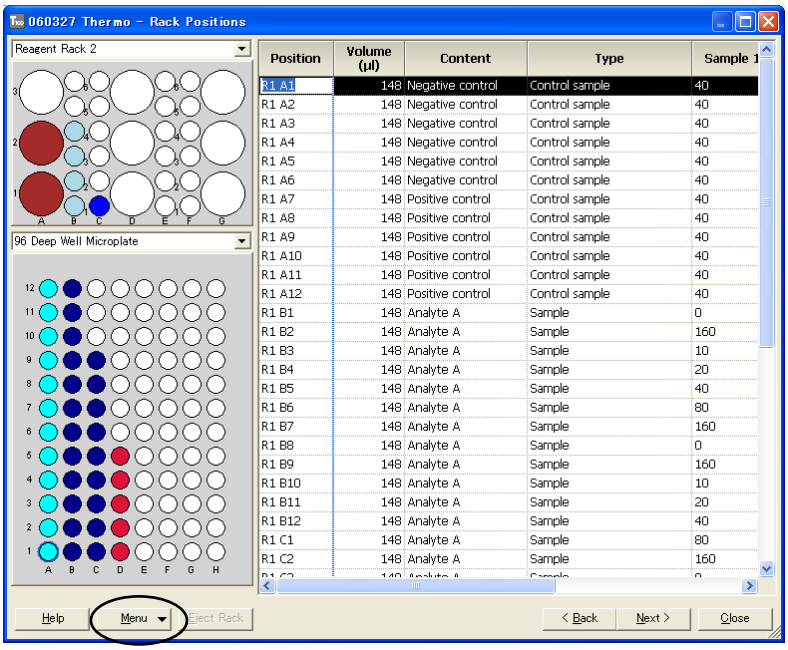
右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-53. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...** を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

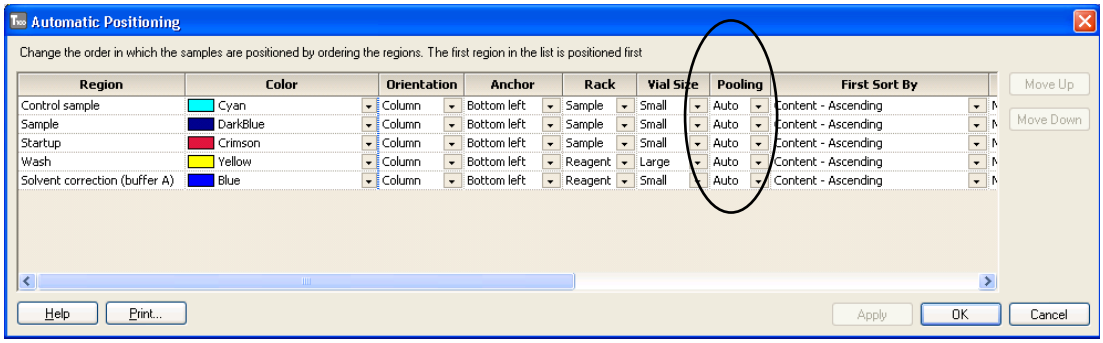
補足 5-54. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu から **Automatic Positioning...**を選ぶ。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定をおこなうことができる。
“Pooling”の項目は、通常、Auto になっている。
同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックする。

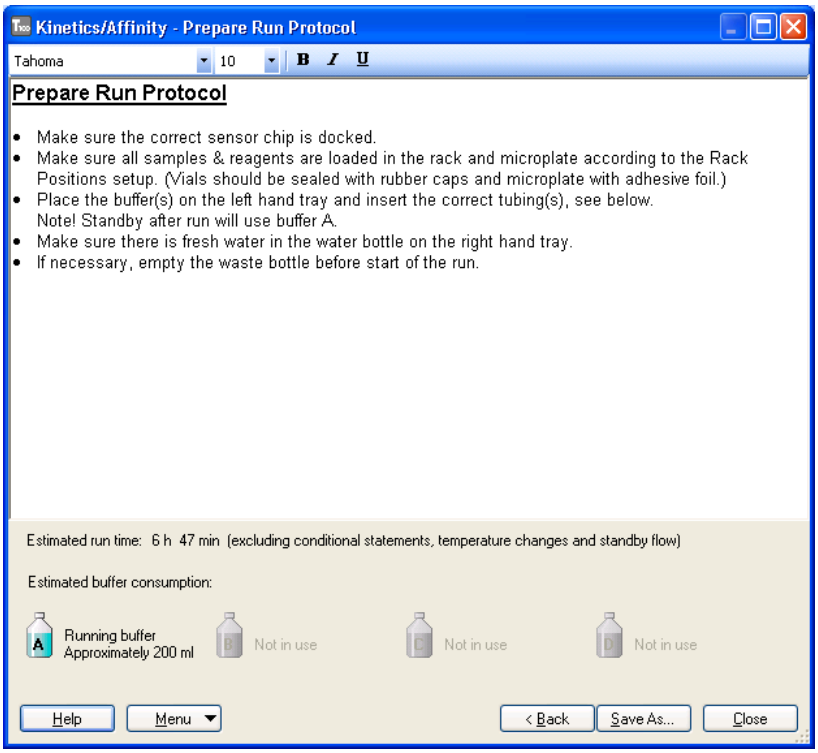
なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、OK をクリックする。
Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の Next をクリックする。

↓

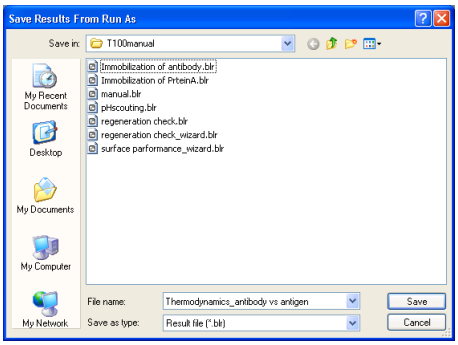

Kinetics/Affinity - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 6 h 47 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
A
Running buffer
Approximately 200 ml
B
Not in use
C
Not in use
D
Not in use
Help
Menu
< Back
Save As...
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示される。
Start をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。
保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、Don’t Save を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

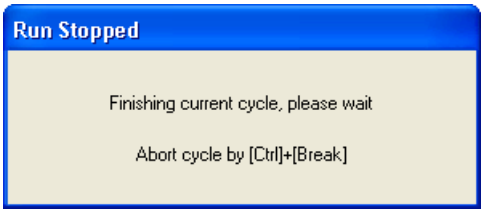
測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示される。

補足 5-55. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックする。

ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

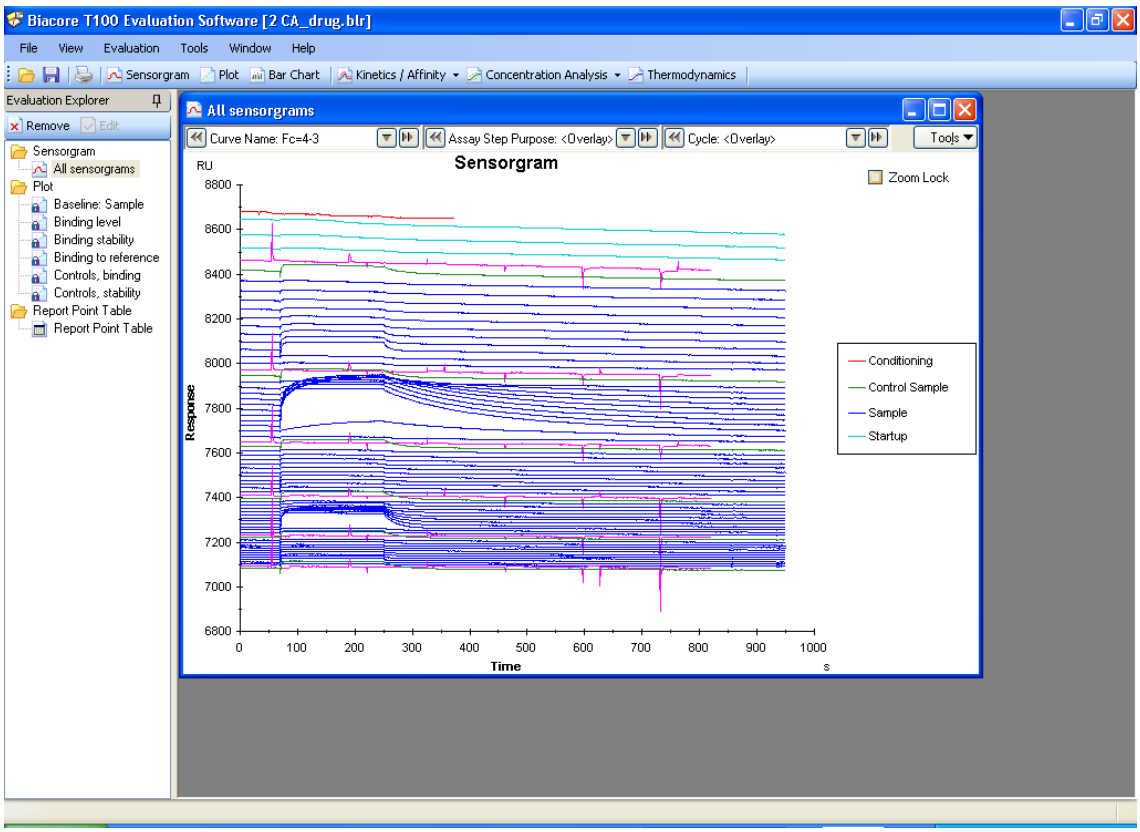
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

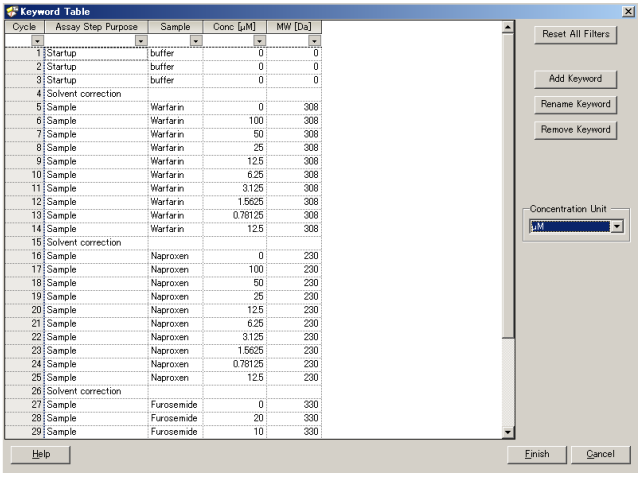
5-5-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。

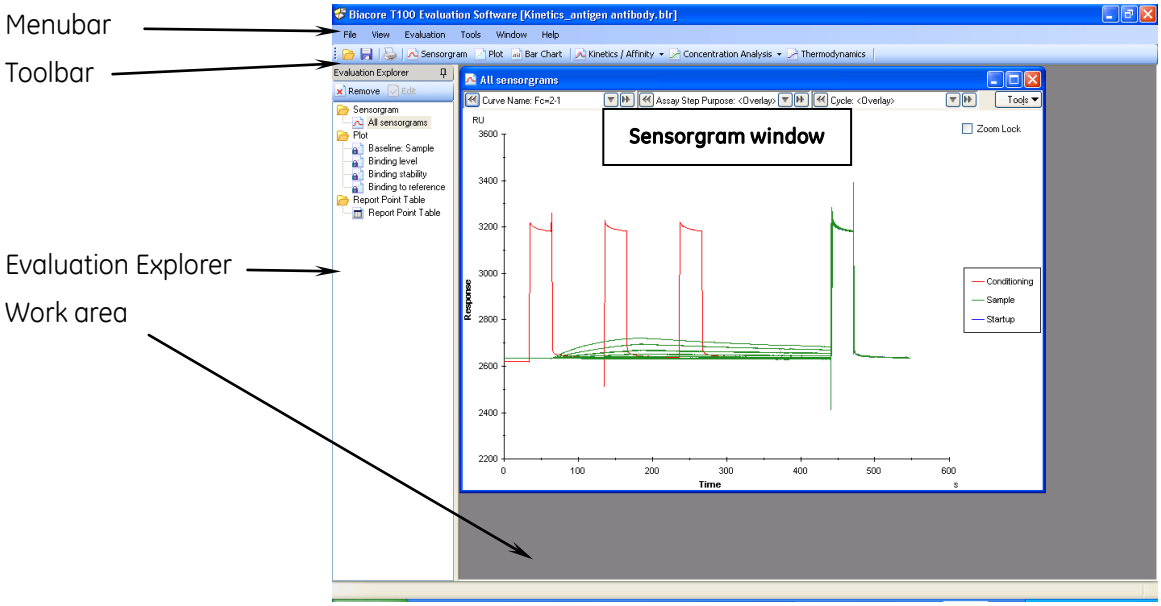


補足 5-56. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table...**で変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。



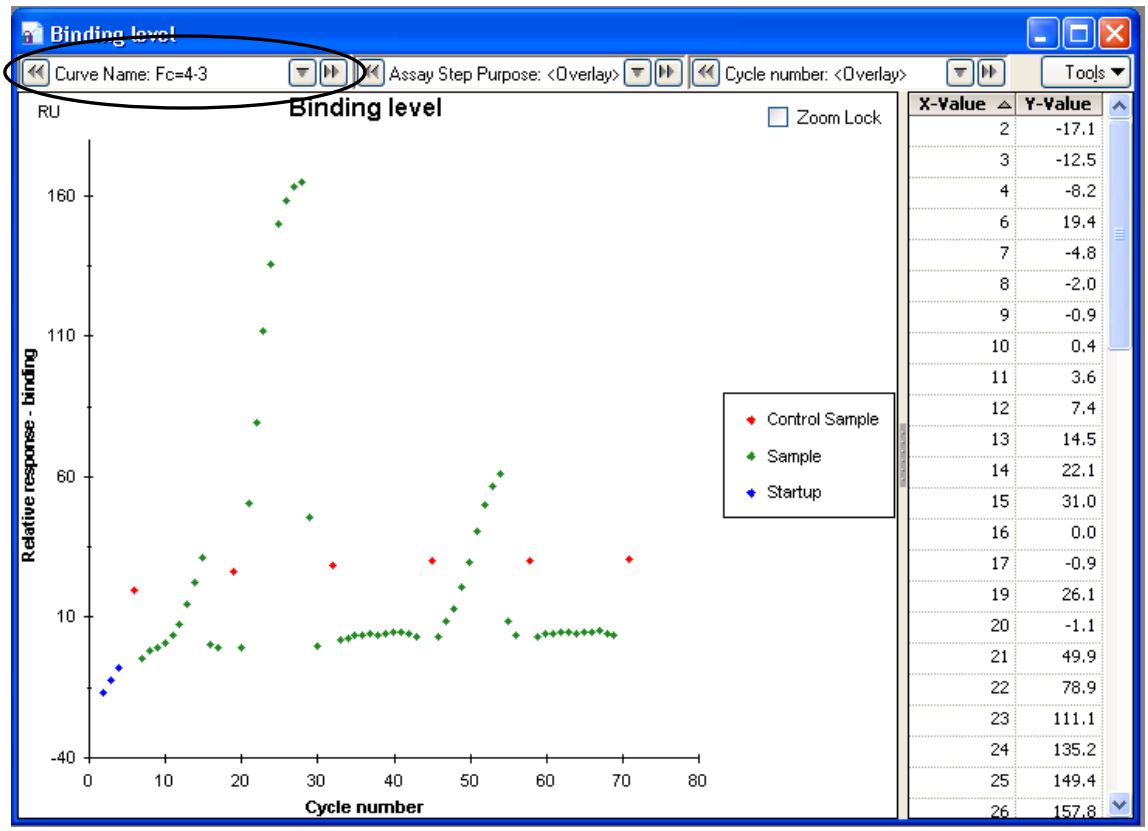
補足 5-57. 画面の説明

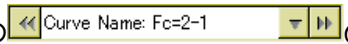


Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Binding level ファイルを利用したランキングとピックアップ

Evaluation Explorer 中の Plot フォルダの **Binding level** をクリックする。
全測定サイクル分（ダミーランによる緩衝液添加、コントロールサンプル測定を含む）について、サンプル添加終了直前の結合レスポンスのプロットとテーブルが表示される。



プロット上部の 

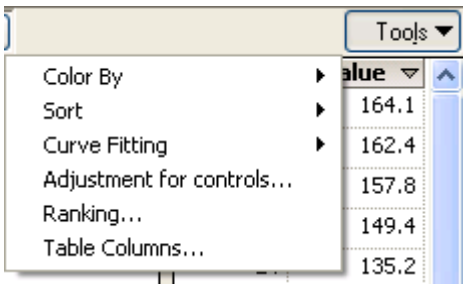
の◀◀もしくは▶▶をクリックし、評価したいデータを選択する。ポイントにマウスを移動すると、サンプル情報が表示される。

↓

プロットの並び替えをおこなう場合は、右側のテーブルの Y-Value をクリックする。
カラムタイトルが、Y-Value ▲ に変更され、結合レスポンスが低い順に並び替えられる。
引き続き、Y-Value ▲ をクリックすると、カラムタイトルは Y-Value ▼ に変更され、高い順に並ぶ。

↓

結合量別にピックアップをおこなう場合は、右テーブル上部 Tools をクリックする。



Ranking...をクリックする。

↓

評価基準となる結合レスポンス（RU)、非結合レスポンス（RU）等を設定する。

One Ranking Boundary

境界基準を 1 つ設定する。**First value:**に評価基準となる数値を入力する。

（例）ネガティブコントロールサンプルの結合レスポンス　　2（RU)

Two Ranking Boundaries

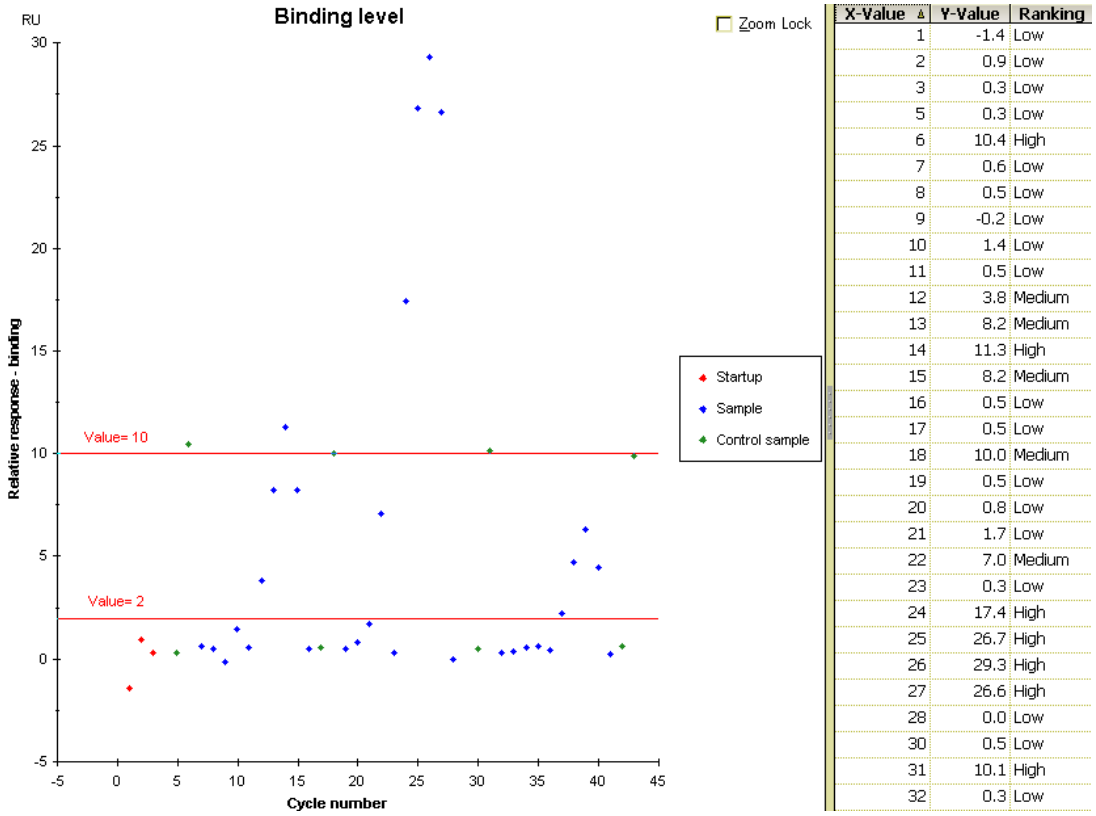
境界基準を 2 つ設定する。**First value:**および **Second value:**に評価基準となる数値を入力する。

（例）ポジティブコントロールサンプルの結合レスポンス　　50（RU)

Finish をクリックする。

↓

設定した結合レスポンスの値にラインが引かれる。同時に、右表には、First value 値より結合レスポンスが低いサイクルには Low、Second value 値より高いものには High、その中間に属するものには Medium の表示が入る。

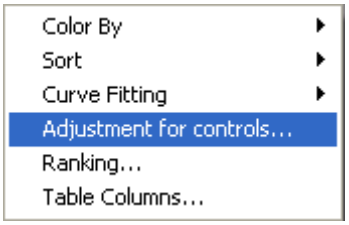


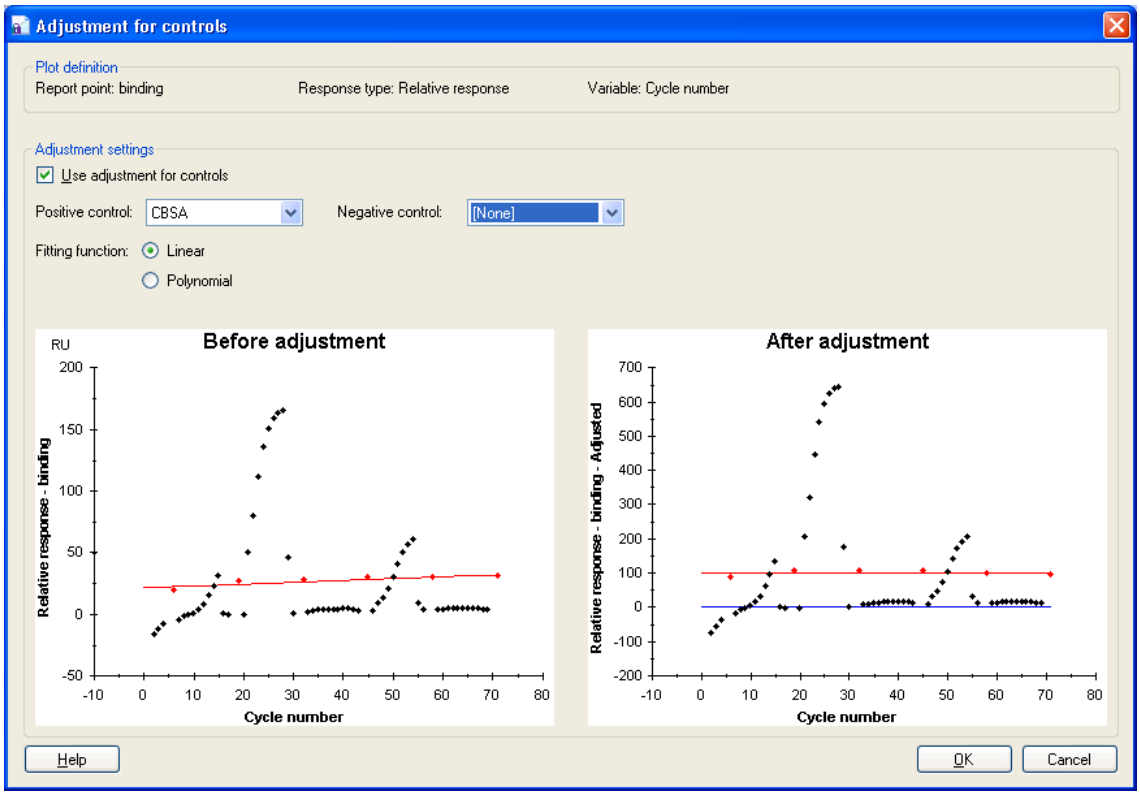
X-Value	Y-Value	Ranking
1	-1.4	Low
2	0.9	Low
3	0.3	Low
5	0.3	Low
6	10.4	High
7	0.6	Low
8	0.5	Low
9	-0.2	Low
10	1.4	Low
11	0.5	Low
12	3.8	Medium
13	8.2	Medium
14	11.3	High
15	8.2	Medium
16	0.5	Low
17	0.5	Low
18	10.0	Medium
19	0.5	Low
20	0.8	Low
21	1.7	Low
22	7.0	Medium
23	0.3	Low
24	17.4	High
25	26.7	High
26	29.3	High
27	26.6	High
28	0.0	Low
30	0.5	Low
31	10.1	High
32	0.3	Low

補足 5-58. コントロールサンプルによる結合量補正

経時的にリガンドが失活する場合や、再生条件が不十分な場合には、サイクルごとにリガンドの結合キャパシティーが低下している。コントロールサンプルを定期的に測定している場合には、コントロールサンプルの結合量低下が確認できる。この場合、結合量のランキングを正確におこなうことができない。正確なランキングをおこなうためには、コントロールサンプルの結合量に基づき、リガンドの最大結合量を考慮した結合量の補正をおこなうと良い。

分子量補正をおこなっていないプロットでリガンドの最大結合量補正をおこなう。
補正をおこないたいプロットを表示す Tools の、**Adjustment for controls...**をクリックする。





Adjustment settings の **Use adjustment for controls** にチェックを入れる。

Positive control:　利用するポジティブコントロールを選択する。**Negative control:**　利用するネガティブコントロールを選択する。

なお、ネガティブコントロールを選択しない場合には、Y=0（RU）をネガティブコントロールとして補正する。

Fitting function:　フィッティングに利用する式を選択する。**Linear**（線形式）または **Polynomial**（多項式）を選択する。

ウインドウ右側に補正後のプロットが表示される。ポジティブコントロールのフィッティングラインが Y 軸=100 で、ネガティブコントロールのフィッティングラインが Y 軸=0 で表示される。

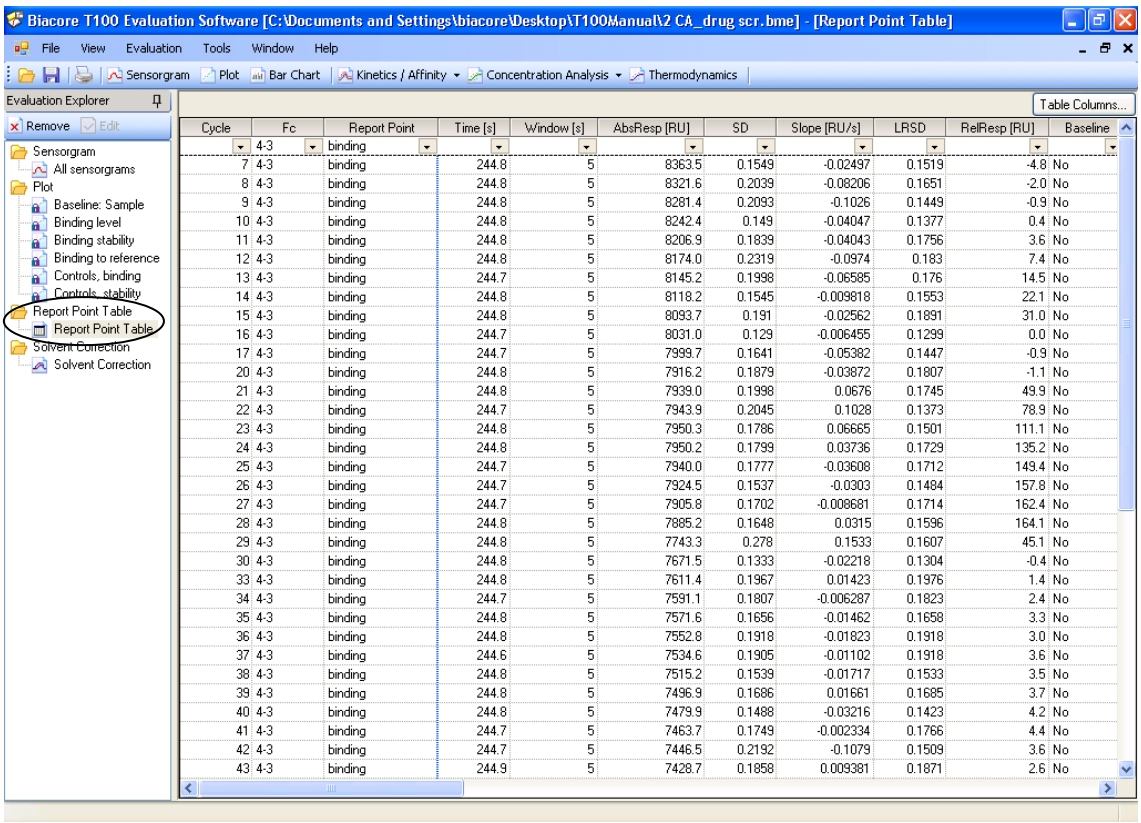
OK をクリックすると、補正後のプロットが表示される。

レポートポイントテーブルを用いたランキングとピックアップ

Evaluation → **Add Report Point Table...**をクリックする。

↓

Evaluation Explorer に **Report Point Table** フォルダとファイルが追加され、**Work area** には、全測定サイクル分のデータが表示される。



各カラム上部のフィルター ▼ を使用し、必要データの抽出をおこなう。

Fc	リファレンス差し引きデータ
Report Point	binding（結合レスポンスのレポートポイント名）
Assay Step	Sample（緩衝液添加サイクル等を除く）

抽出終了後、 RelResp [RU] を 2 回クリックする。

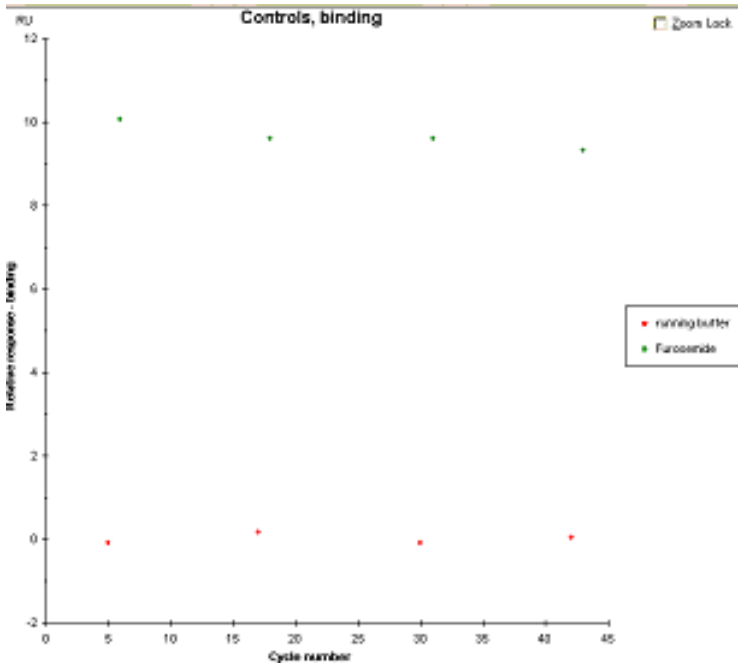
↓

結合レスポンスが高い順に並ぶ。

補足 5-59. クオリティーチェック

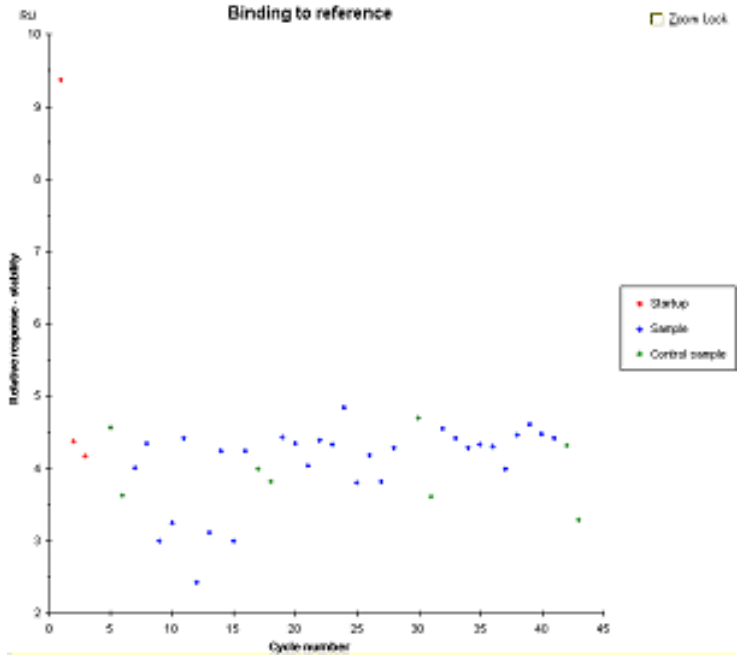
コントロールサンプルのレスポンスチェック

リガンドの安定性評価が目的で、定期的にコントロールサンプルを添加している場合、Evaluation Explorer 中の Plot フォルダに存在する controls: binding データでチェックする。



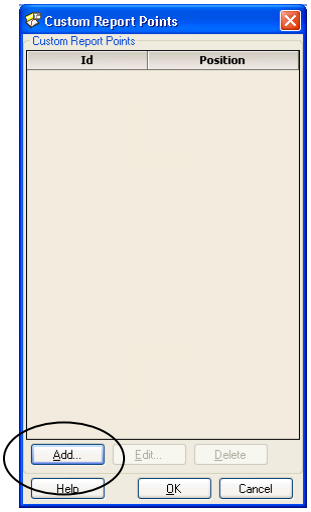
リファレンスセルへの非特異的吸着量チェック

Evaluation Explorer の Plot フォルダの Binding to reference データでチェックする。



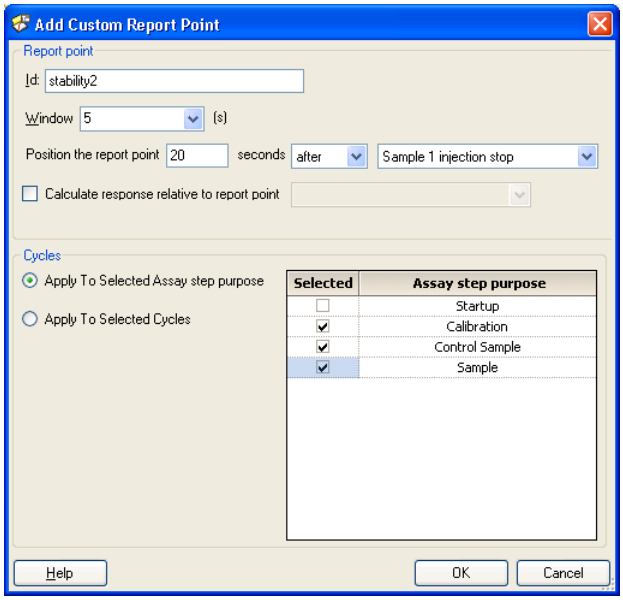
補足 5-60. レポートポイントの追加

Tools → Custom Report Points...をクリックする。



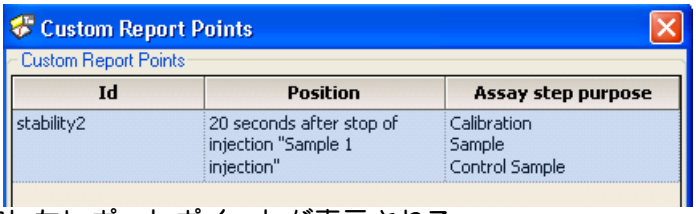
Add...をクリックする。

↓



Id にレポートポイントの名前を入力する。追加する位置を設定し、Cycles でどのサイクルで記録するか設定する。OK をクリックする。

↓

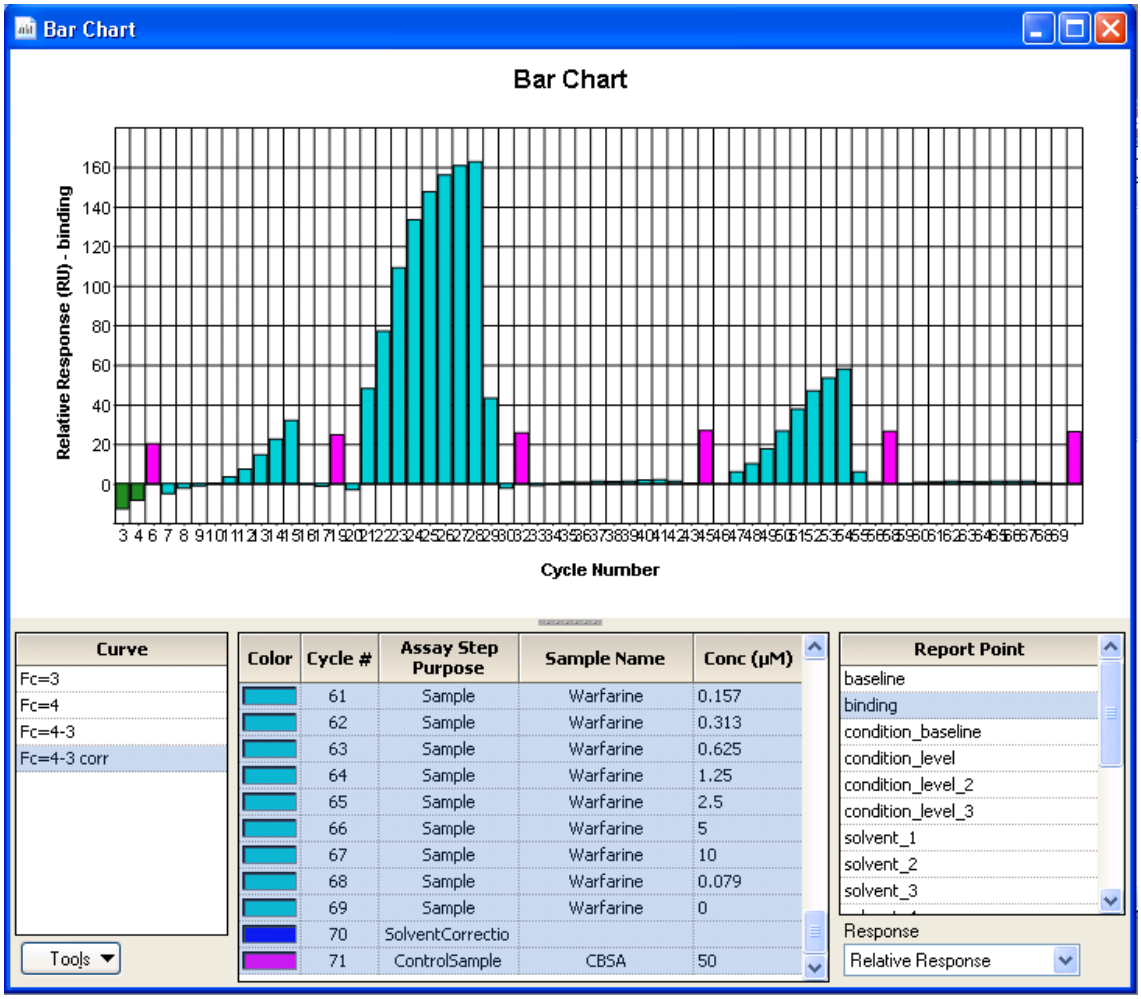


初期画面に、追加したレポートポイントが表示される

補足 5-61. 結合量のグラフ化

結合量を棒グラフとして表示する場合には、Toolbar の

をクリックする。



結合量が棒グラフとして表示される。

Curve でグラフ化するセンサーグラムを選択する。複数選択も可能。

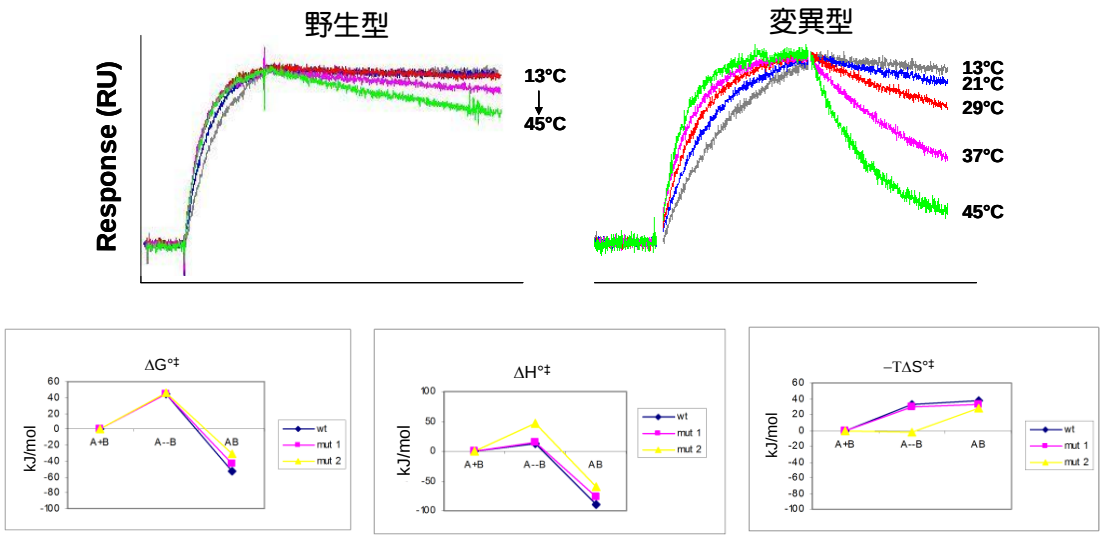
表示方法、色、カラムラベルの表示の変更をおこなう場合には、Tools をクリックして変更したい項目を選択する。

5-6. 熱力学的パラメータの算出

熱力学的解析

熱力学的パラメータは、分子同士の相互作用メカニズム解析に対して重要な情報を提供する。Biacore では、熱力学的パラメータは、複数の温度条件で速度論的相互作用解析を実施することで算出できる。平衡状態における熱力学的パラメータ（ΔG°、ΔH°、ΔS°）のみならず、遷移状態における熱力学的パラメータ（ΔG°‡、ΔH°‡、ΔS°‡）も算出することが可能である。平衡状態におけるパラメータからは“その分子同士がその強さで結合する理由”、遷移状態におけるパラメータからは“その分子同士がその速度で結合、解離する理由”を議論することができる。

例として、ある抗原と抗体（野生型と 2 種類の変異型）の相互作用を紹介する。
通常の速度論的解析では、ある温度で相互作用測定を実施し、算出された反応速度定数の比較から野生型と変異型の結合および解離速度の違いを知ることができる。さらに、熱力学的解析の結果からは、下図に示したように、変異型 2 のΔH°‡とΔS°‡が野生型および変異型 1 のそれらとは大きく異なっていることがわかる。すなわち、変異型 2 は野生型および変異型 1 とは異なった様式で相互作用していることが示唆される。



熱力学的パラメータの解析手順

数段階の温度（4 段階以上）において同一分子間の相互作用測定をおこない、解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a, k_d）を算出する。
平衡状態、遷移状態における熱力学的パラメータ算出には、それぞれ次式を応用している。
各温度において算出した解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a, k_d）を代入する。

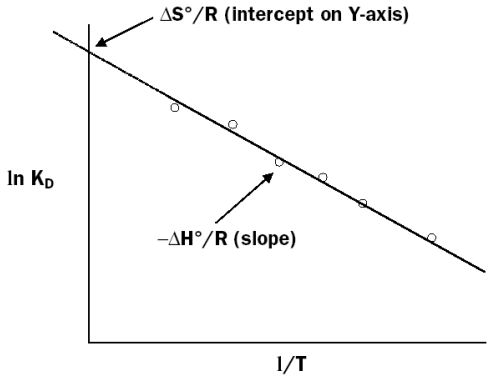
平衡状態における熱力学的パラメータ算出

van't Hoff 式を応用する。各温度における解離定数（K_D）を代入し、各種パラメータを算出する。線形解析と非線形解析により算出可能。非線形解析が主流である。

線形解析

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_D$$
$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$
$$\ln K_D = \Delta H^\circ / RT - \Delta S^\circ / R$$

ΔG°	自由エネルギー変化（kJ/mol）
R	気体定数
T	絶対温度（K）
K_D	解離定数（M）
ΔH°	エンタルピー変化（kJ/mol）
ΔS°	エントロピー変化（J/K・mol）



非線形解析

$$RT \ln K_D = \Delta H^\circ_{T_0} - T\Delta S^\circ_{T_0} + \Delta C_p^\circ \left(T - T_0 \right) - T\Delta C_p \ln \left(T / T_0 \right)$$

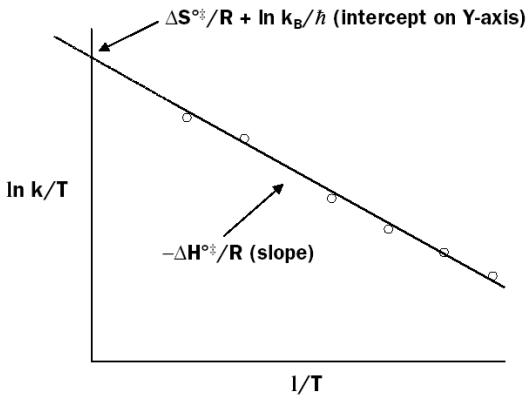
ΔC_p	熱容量変化（kJ/K・mol）
T_0	基準温度（標準状態では 25℃）

遷移状態における熱力学的パラメータ算出

Eyring 式を応用する。各温度における反応速度定数（k_a, k_d）を代入し、各種パラメータを算出する。

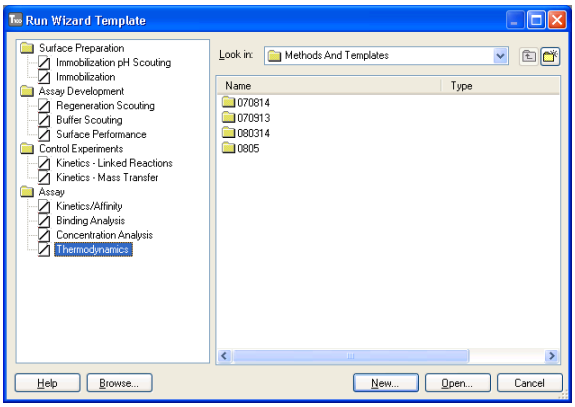
$$k = \left(k_B T / h \right) \exp \left(\Delta S^{\circ\ddagger} / R - \Delta H^{\circ\ddagger} / RT \right)$$
$$\ln k / T = \Delta S^{\circ\ddagger} / R - \Delta H^{\circ\ddagger} / RT + \ln kB / h$$

k	各反応速度定数
k_B	ボルツマン定数
h	プランク定数
$\Delta S^{\circ\ddagger}$	エントロピー変化（J/K・mol）
R	気体定数
$\Delta H^{\circ\ddagger}$	エンタルピー変化（kJ/mol）
T	絶対温度（K）
$\Delta G^{\circ\ddagger}$	自由エネルギー変化（kJ/mol）



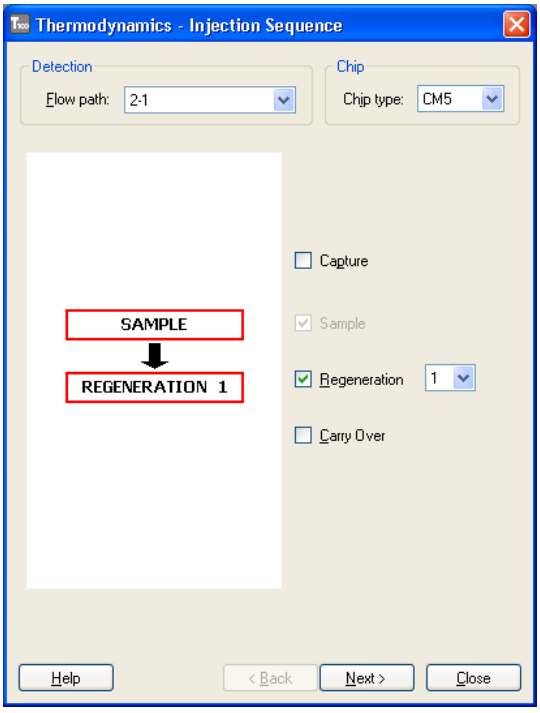
5-6-1. プログラムの実行

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。



Assay → **Thermodynamics** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



1 サイクル分の測定シークエンスを設定する。

Detection

Flow path　測定をおこなうフローセルを設定する。
基本的にリファレンスの差し引き機能を利用するのが望ましい。なお、キャプチャー法を利用する場合、差し引き機能として 2-1 または 4-3 の選択のみとなる。

Chip

Chip type　利用するセンサーチップを選択する。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドをトラップする場合にチェックを入れる。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされる。

Sample

アナライトの添加

Regeneration

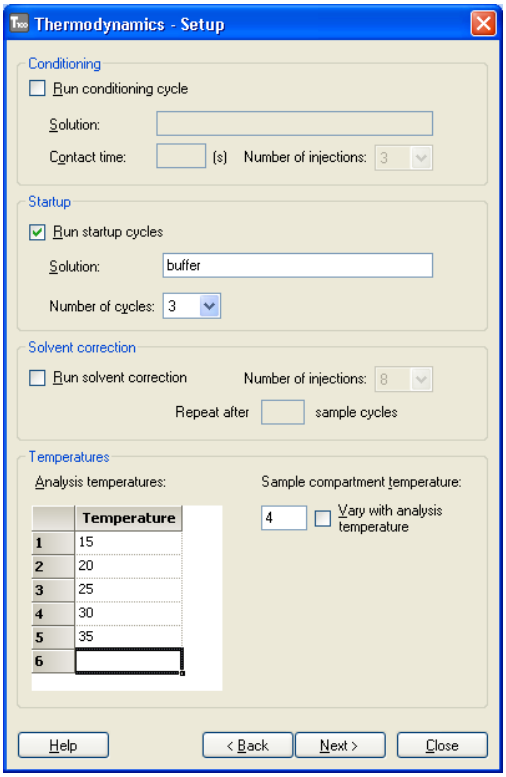
再生が必要な場合にチェックを入れる。添加回数 1 回または 2 回。

Carry Over

アナライトのキャリーオーバーの確認をおこないたい場合にチェックを入れる。

Next >をクリックする。

↓



Conditioning

Solution　再生溶液または緩衝液の名称

contact time　添加時間（s）

Number of injections　添加回数

Startup

Solution　指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施する。通常は、ランニング緩衝液を用いる。

Number of cycles　サイクル数。3 回以上を推奨する。

Solvent correction

低分子化合物がアナライトで溶媒補正が必要な場合にチェックを入れる。

5-7. 低分子化合物アナライトの相互作用を参照。

Number of injections　溶媒補正の測定点を選択する。何サンプルごとに溶媒補正を実施するかを、**"Repeat after [　　] Sample cycles"**で指定する。

Temperatures

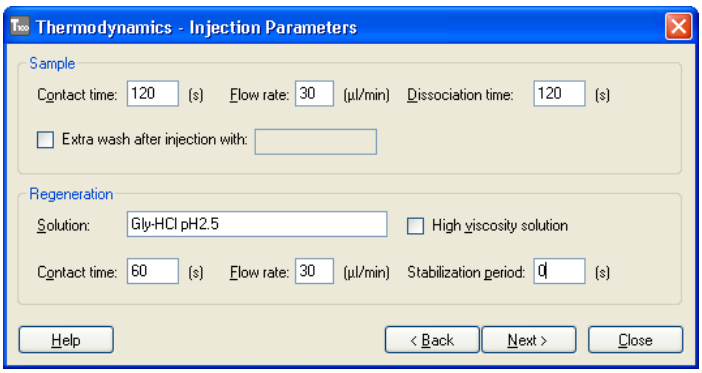
Analysis temperatures　検出部位の温度を設定する。25℃を真ん中に、5 点以上を推奨。

Sample compartment temperatures

サンプルコンパートメントの温度を入力する。

Next >をクリックする。

↓



Sample

contact time	アナライトの添加時間	120 s
Flow rate	流速	30 µl/min
Dissociation time	解離時間	120 s

Extra wash after injection with

アナライト添加後に指定した溶液で、フローセル以外

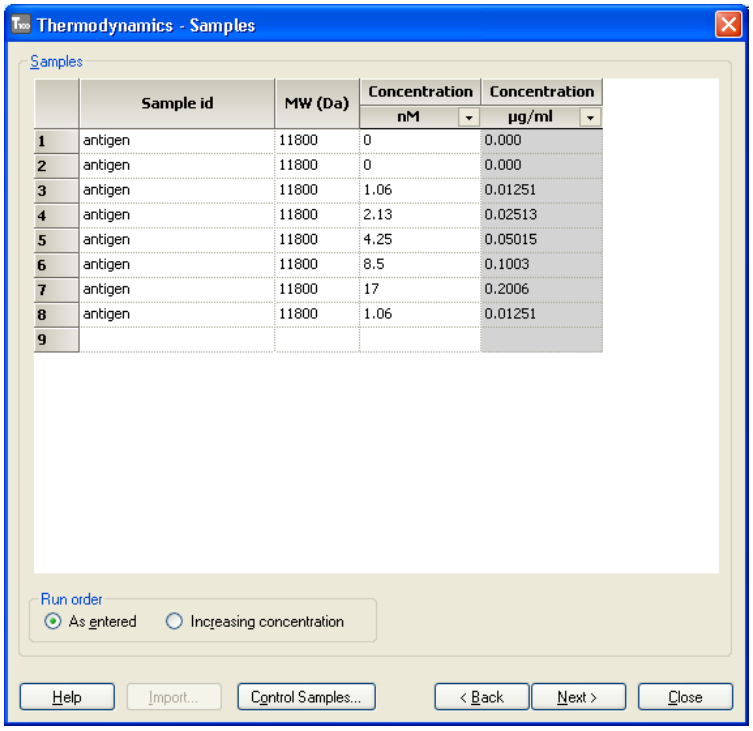
の流路を洗浄したい場合にチェックを入れる。センサーチップ表面には流れない。

Regeneration

Solution	再生溶液の名称	
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40%エチレングリコール以上）の場合に選択する	
contact time	再生溶液の添加時間	60 s
Flow rate	流速	30 µl/min
Stabilization period	添加後のベースライン安定化時間（必要に応じて設定する。）	0 s

入力後、**Next >**をクリックする。

↓



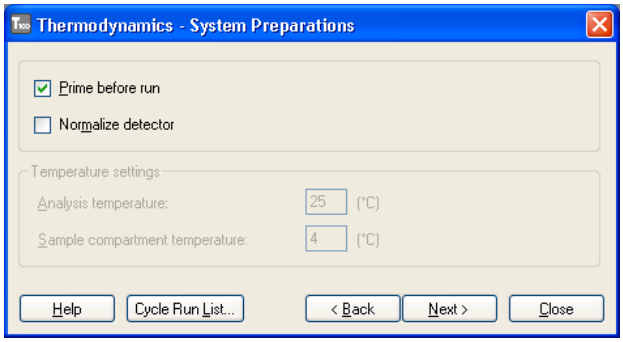
Sample id	アナライトの名称
MW　(Da)	アナライトの分子量
Concentration	アナライトの濃度（単位も選択） 分子量と濃度を入力すると、自動的に“モル濃度 nM ”と“重量濃度 µg/ml”を換算する。

入力後、**Next >**をクリックする。

↓

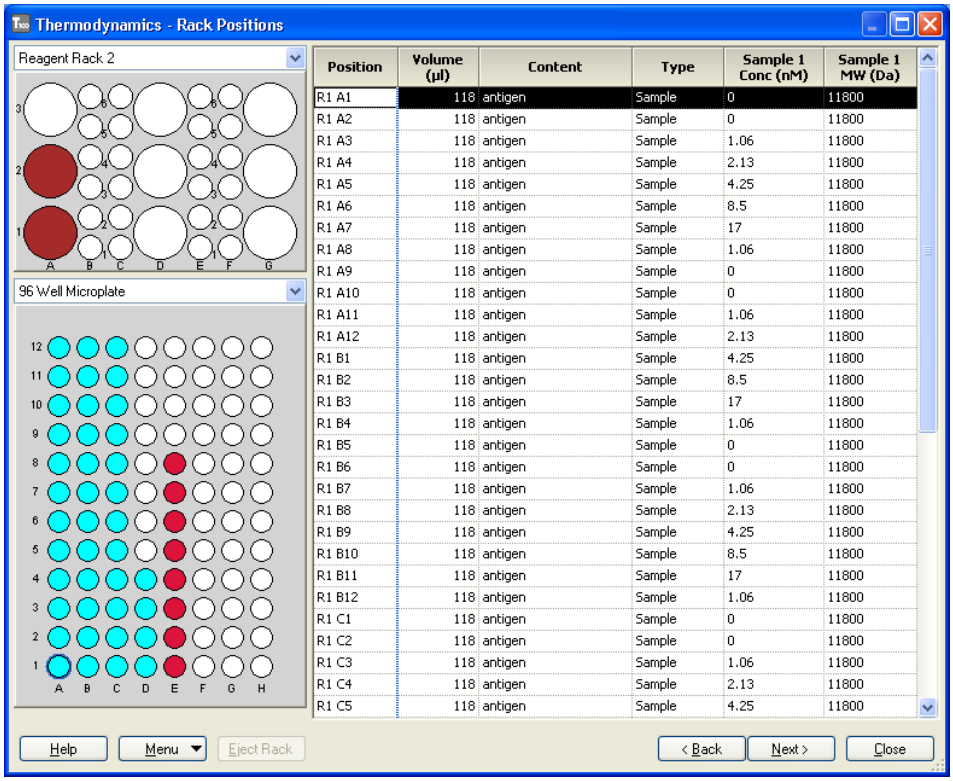
補足 5-62. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。



測定を始める前の **Prime** および **Normalize** の実施を選択する。

↓



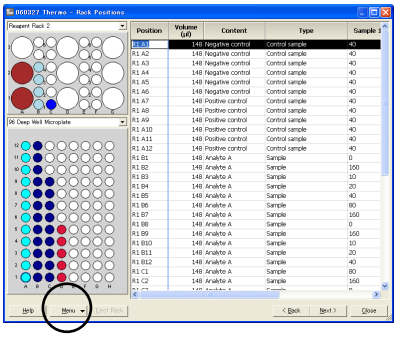
右側の表でサンプルの位置と容量（µl）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-63. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...** を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

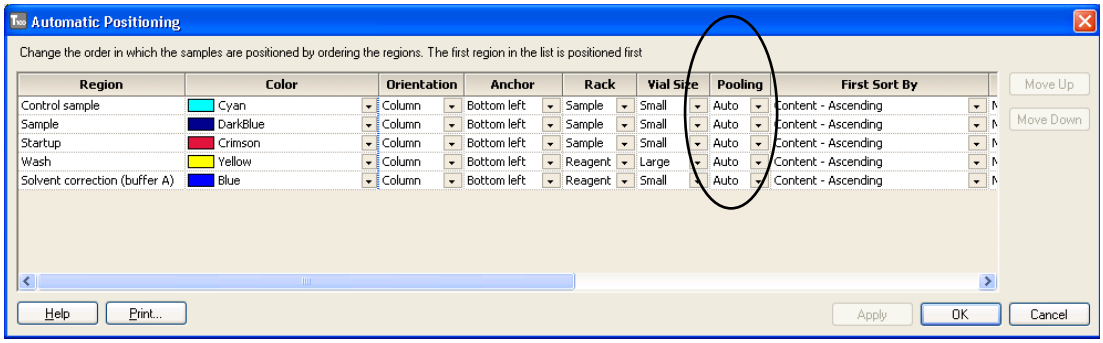
補足 5-64. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される。）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu から **Automatic Positioning...**を選ぶ。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定をおこなうことができる。

“**Pooling**”の項目は、通常、**Auto** になっている。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“**Pooling**”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックする。

なお、**Automatic Positioning** ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

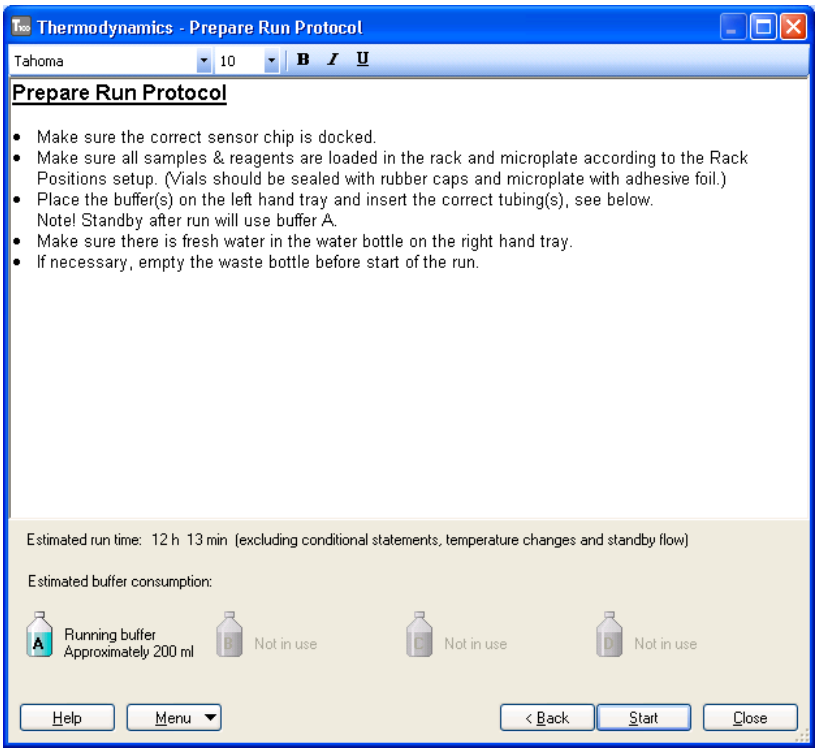
Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックする。

↓


Thermodynamics - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 12 h 13 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
Approximately 200 ml
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

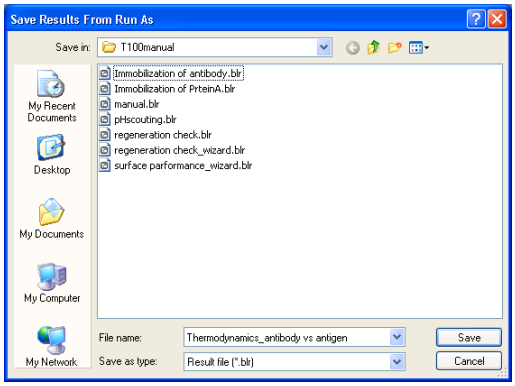
基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示される。

Start をクリックする。

↓

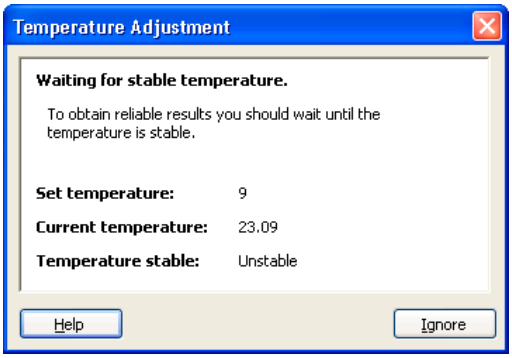
設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓



設定温度に達するまで、上記ウインドウが表示される。設定温度に達すと測定が開始する。

↓

測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

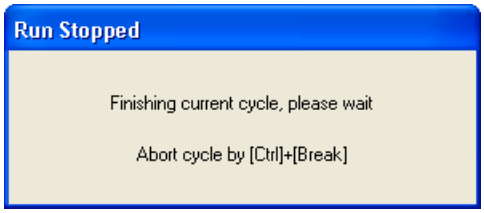
測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動する。

補足 5-65. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックする。

ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

↓

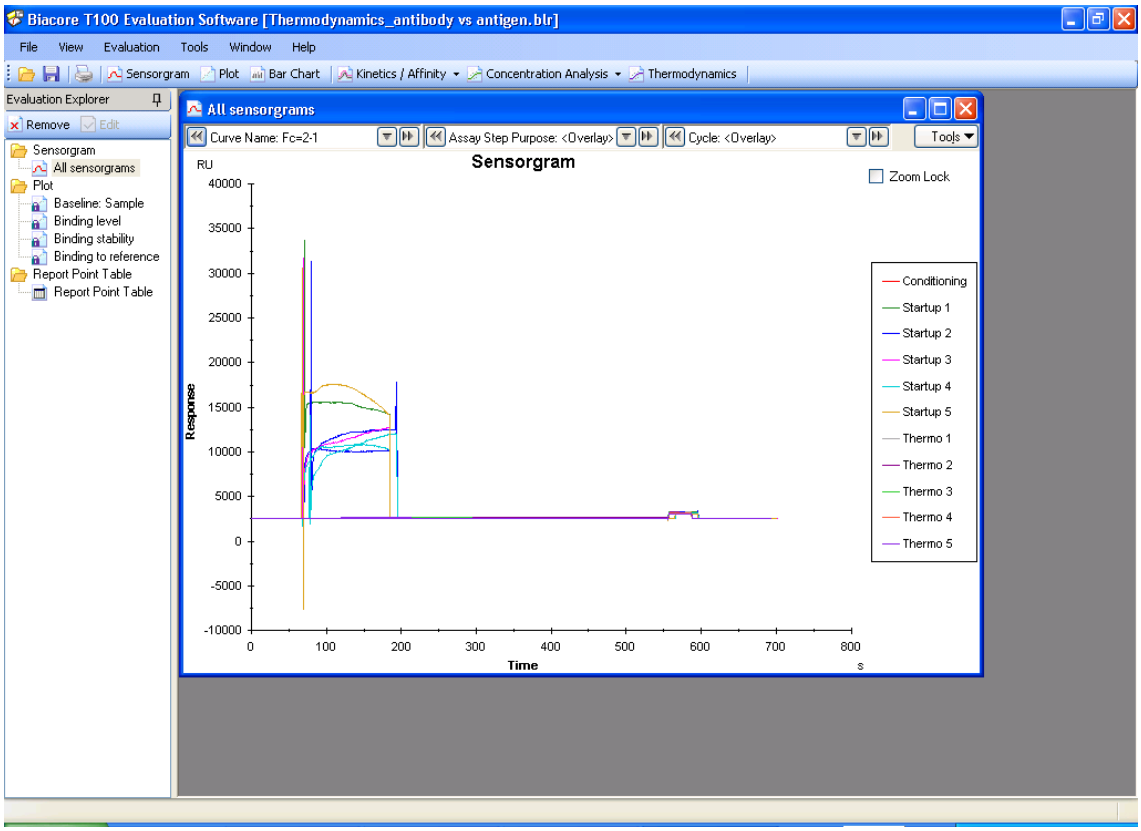


実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。

終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

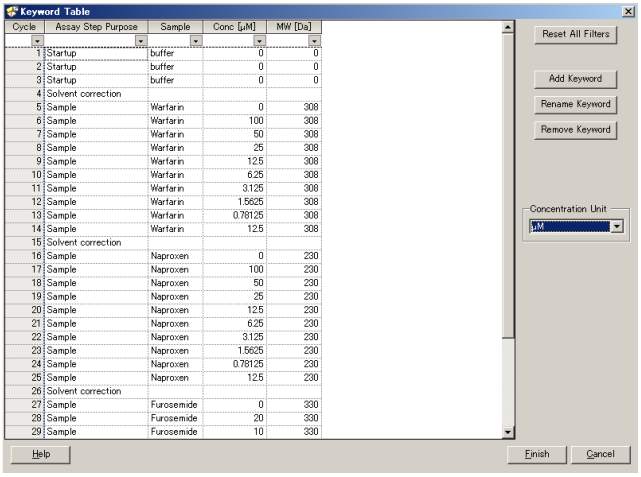
5-6-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。

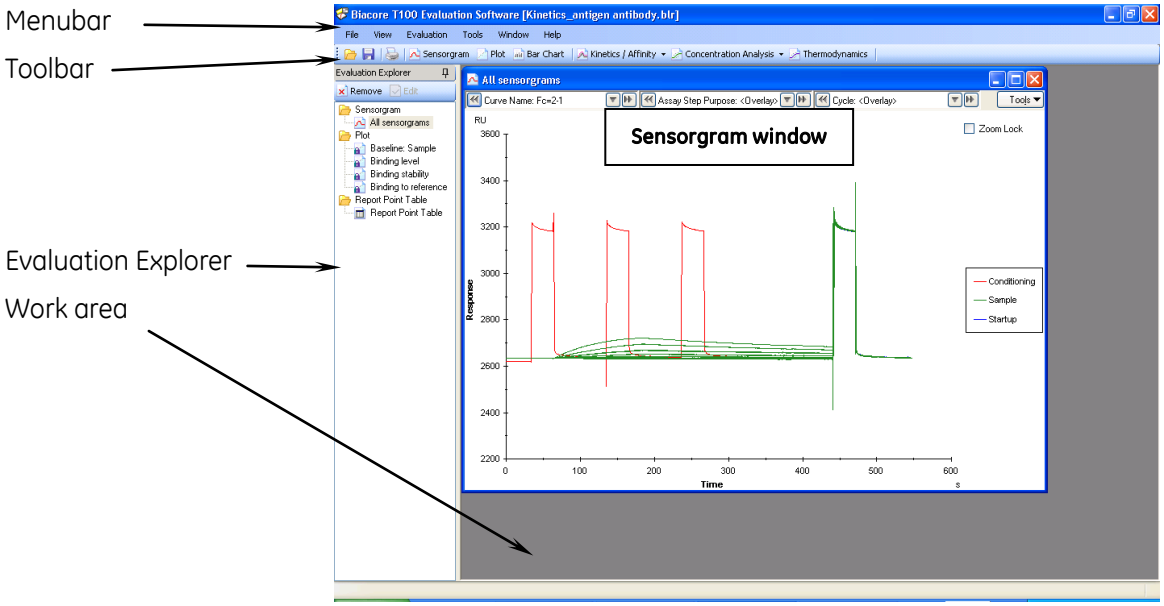


補足 5-66. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table...**で変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。



補足 5-67. 画面の説明

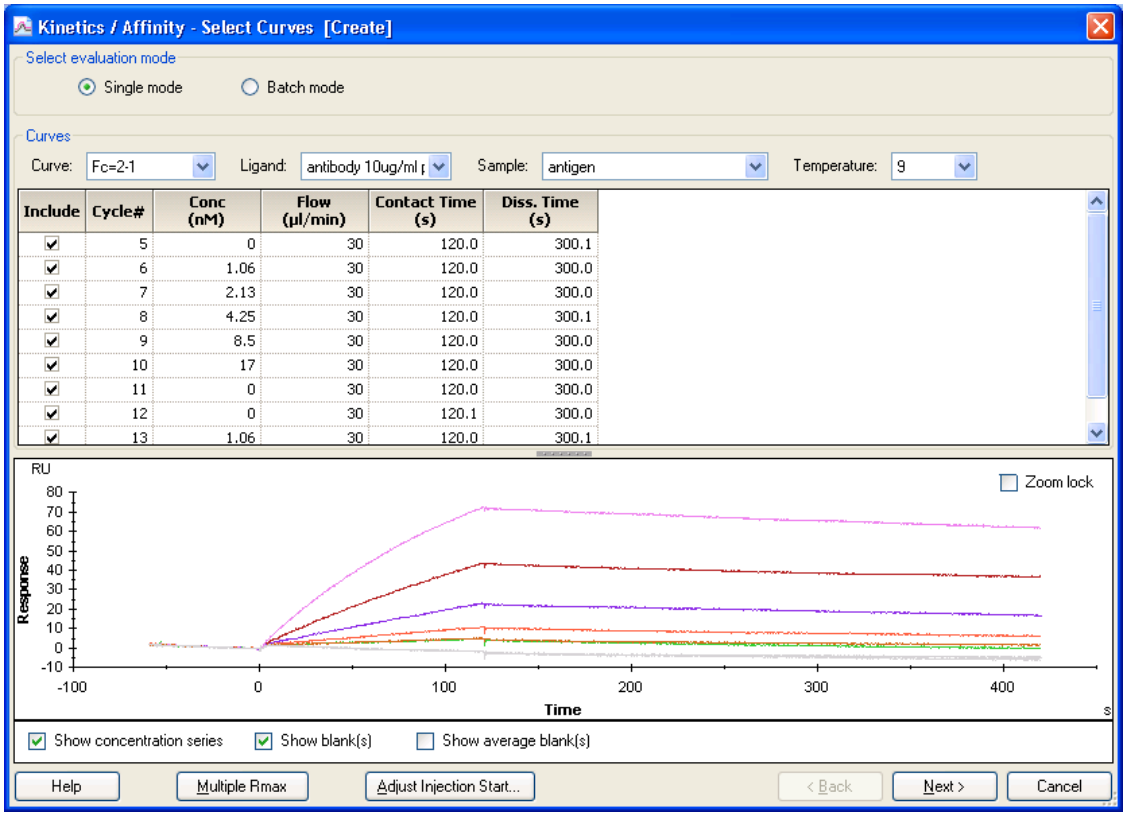


Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

各温度における解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a,k_d）を算出する。
詳細は 5-1. 反応速度定数・解離定数の算出　マルチサイクル法を参照。

Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックする。

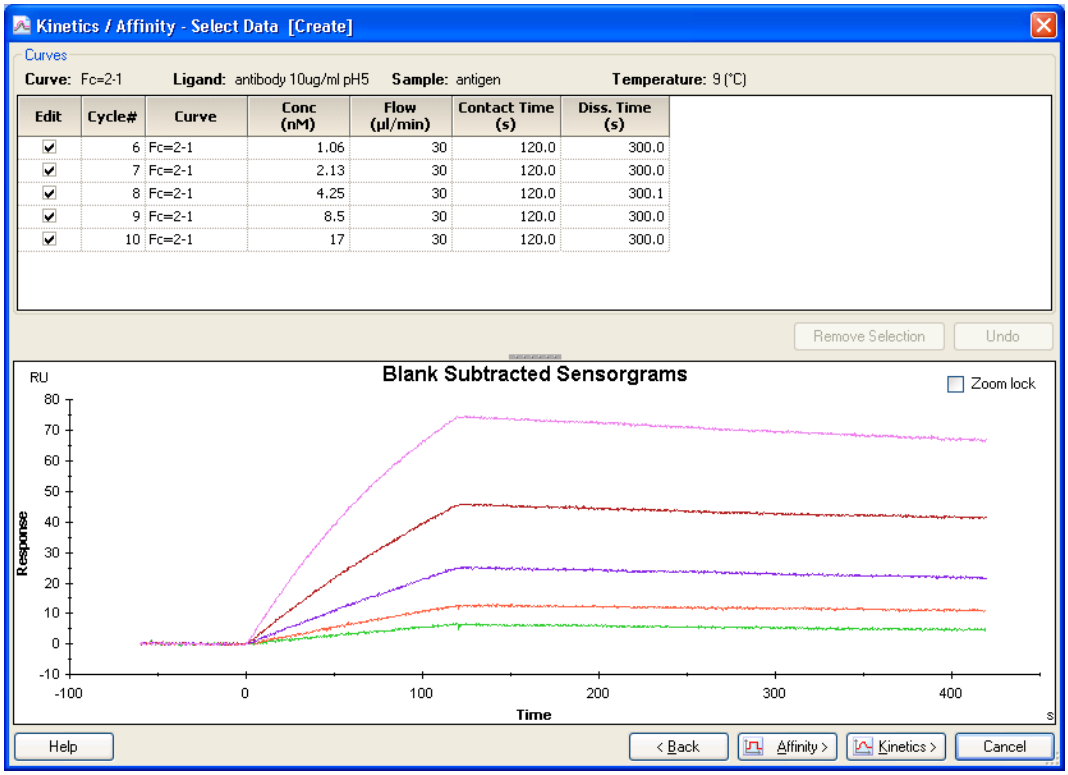
↓


Kinetics / Affinity - Select Curves [Create]
Select evaluation mode
Single mode
Batch mode
Curves
Curve: Fc=2-1
Ligand: antibody 10ug/ml
Sample: antigen
Temperature: 9
Include | Cycle# | Conc (nM) | Flow (µl/min) | Contact Time (s) | Diss. Time (s)
5 | 0 | 30 | 120.0 | 300.1
6 | 1.06 | 30 | 120.0 | 300.0
7 | 2.13 | 30 | 120.0 | 300.0
8 | 4.25 | 30 | 120.0 | 300.1
9 | 8.5 | 30 | 120.0 | 300.0
10 | 17 | 30 | 120.0 | 300.0
11 | 0 | 30 | 120.0 | 300.0
12 | 0 | 30 | 120.1 | 300.0
13 | 1.06 | 30 | 120.0 | 300.1
RU
Zoom lock
Response
Time
Show concentration series
Show blank(s)
Show average blank(s)
Help
Multiple Rmax
Adjust Injection Start...
< Back
Next >
Cancel

同一温度、同一サンプル名のセンサーグラムがすべて重ね書き表示される。

Select Evaluation mode で **Single mode** を選択する。
Next >をクリックする。

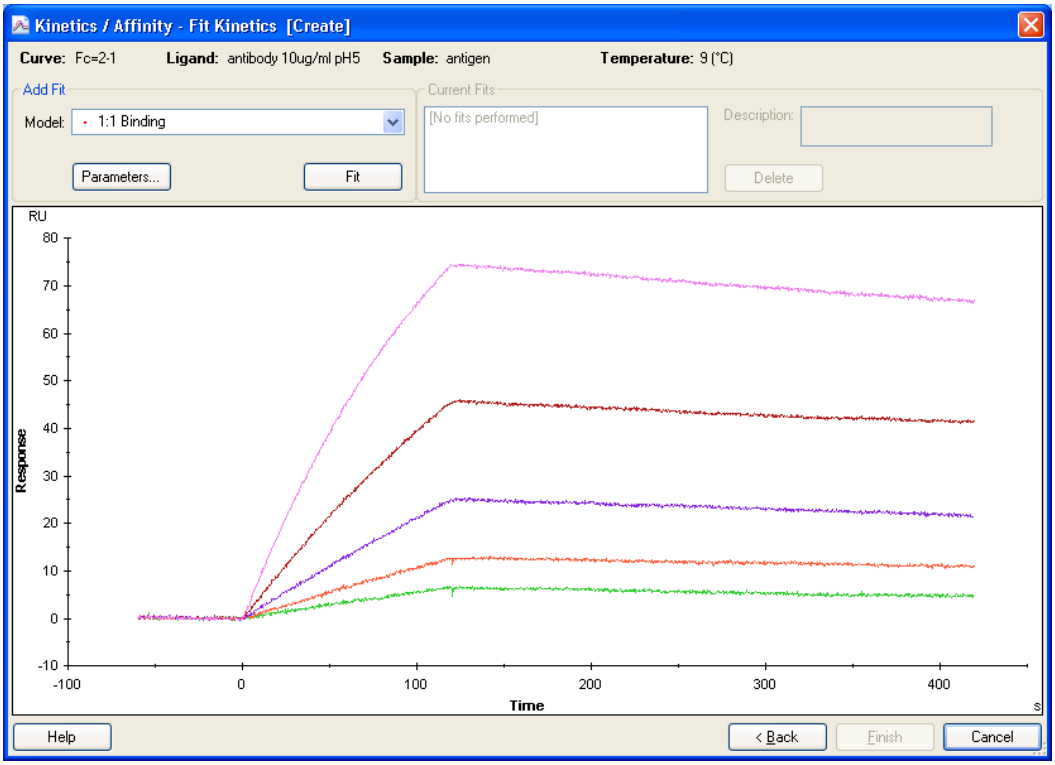
↓



濃度 0 のセンサーグラムが、ブランクとして、全センサーグラムから差し引かれる。

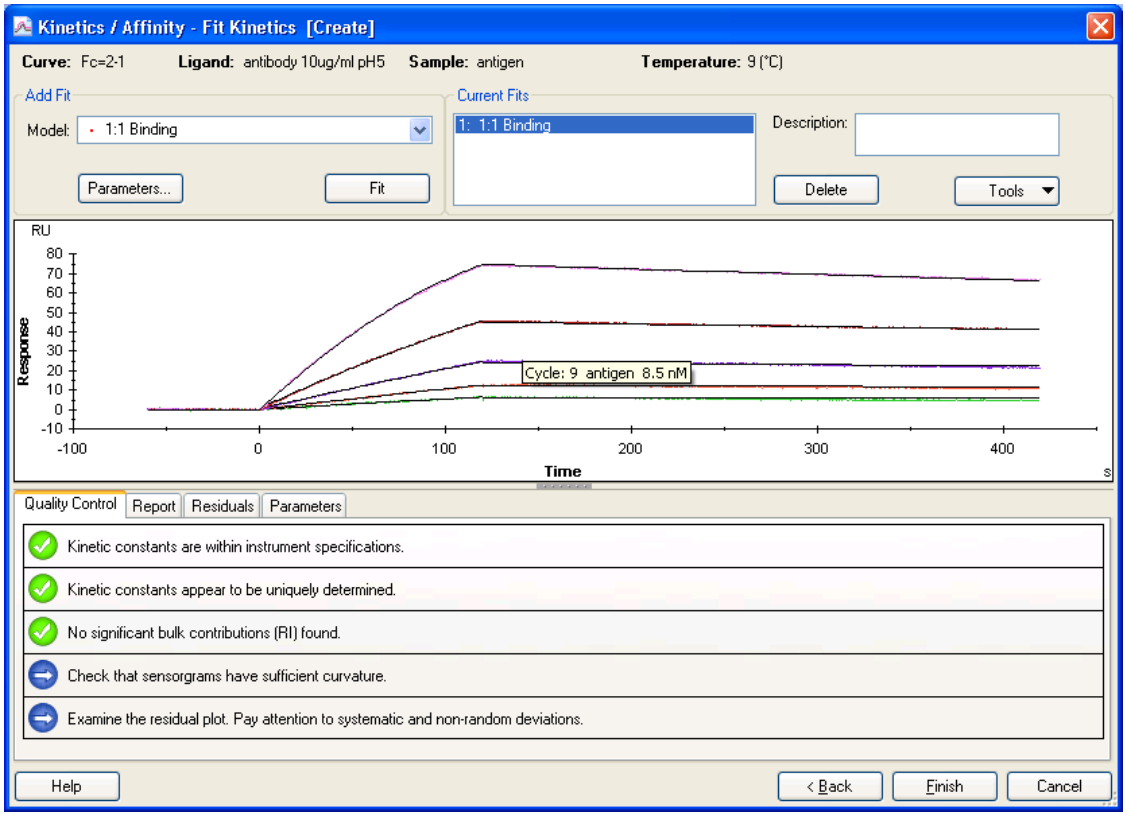
Kinetics >をクリックする。

↓



Model:に、**1:1 Binding** を選択する。**Fit** をクリックする。

↓



Finish をクリックする。

↓

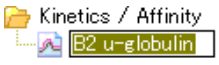
上記解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存される。ファイル名は自動的にサンプル名が採用される。

この実験では、測定温度を変化させて、同一サンプルで同様の実験をおこなうため、どの温度についての解析結果も同一ファイル名（サンプル名）で保存される。混乱を避けるため、この時点でファイル名の変更をおこなうことを推奨。補足 5-68 を参照。

補足 5-68. ファイル名の変更

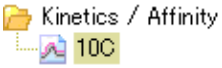
Evaluation Explorer 中の目的ファイルをクリックする。

↓



上記状態で、キーボードの Backspace キーで、ファイル名を一度削除し、新たに新規ファイル名を入力する。

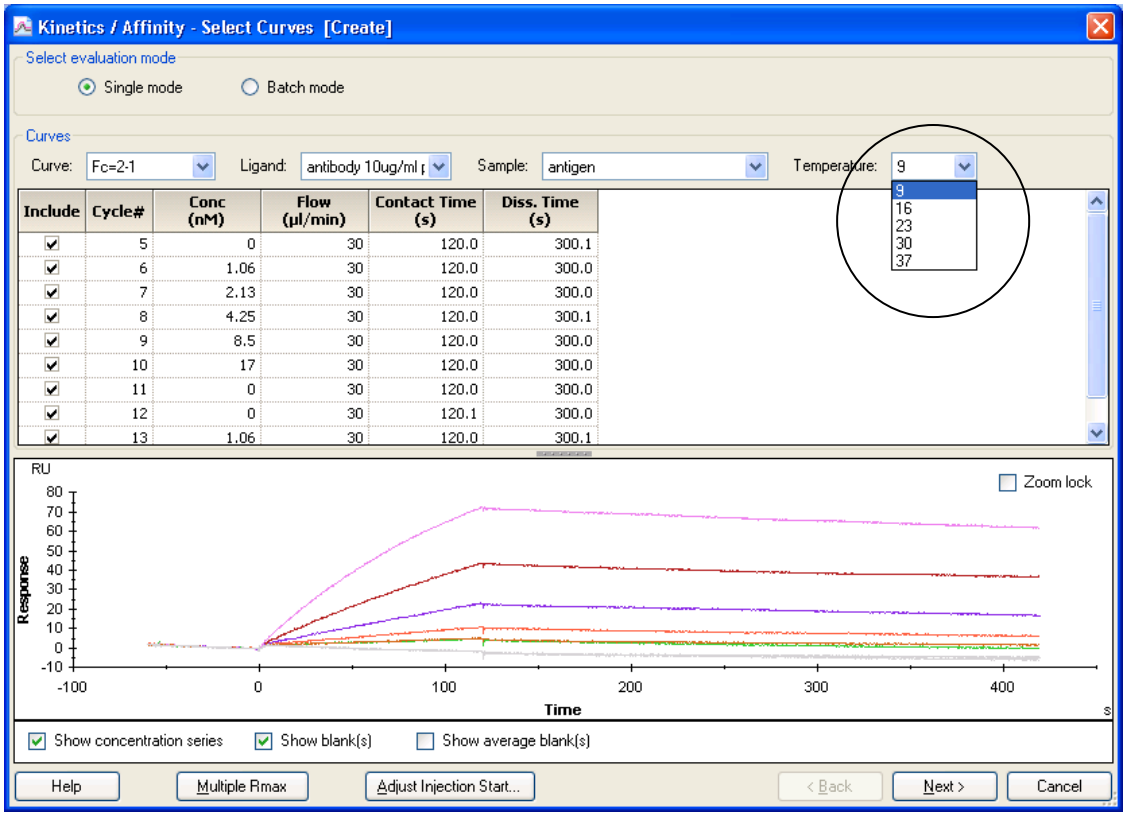
↓



同様に、別の温度の測定データについても解析する。

Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックする。

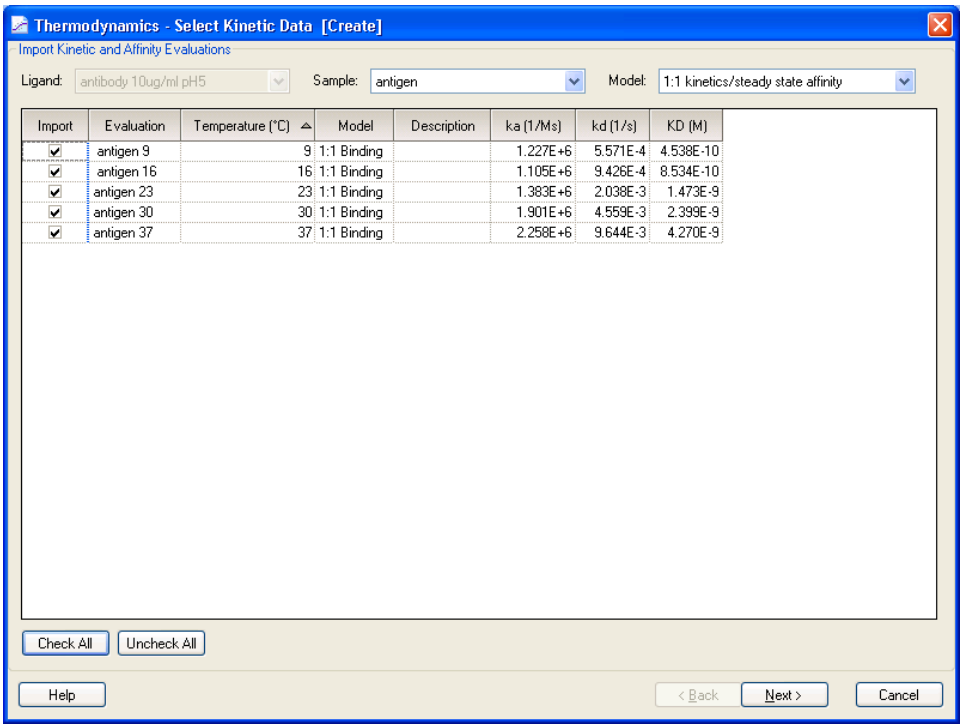
↓



Temperature 右側の▼をクリックする。温度を変更し、反応速度定数（k_a,k_d）の算出をおこなう。

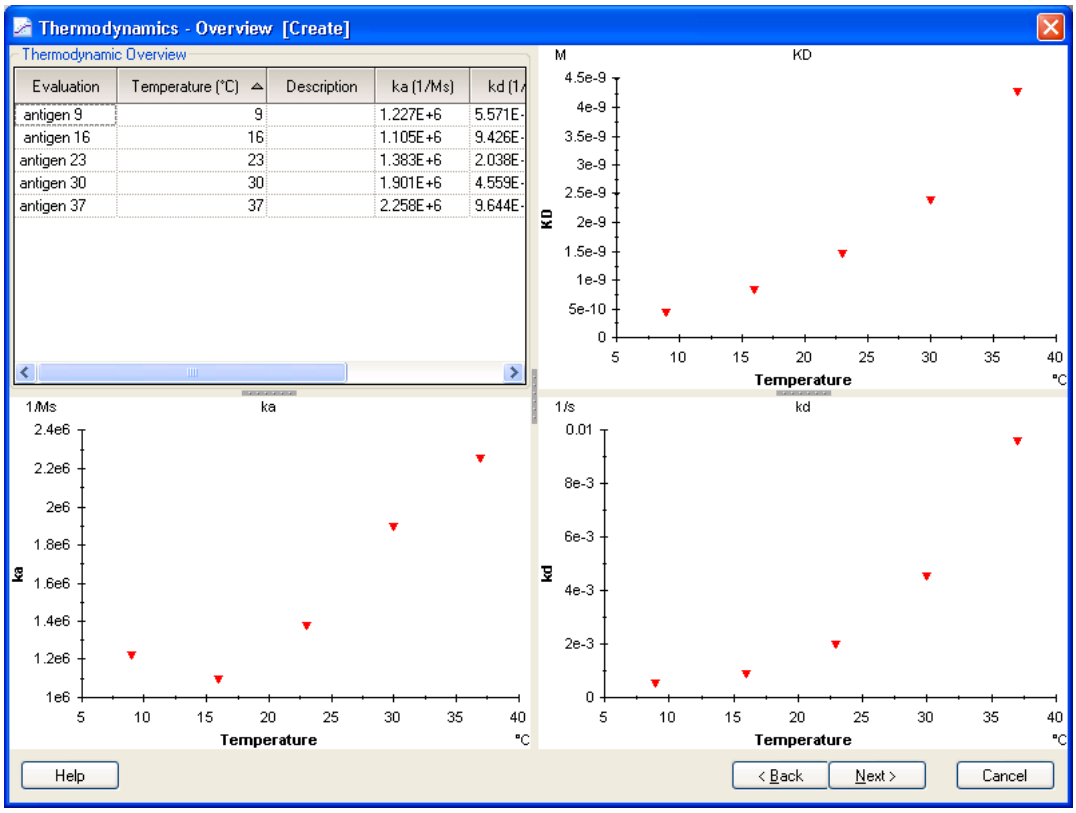
↓

すべての温度について解析終了後、**Toolbar** の Thermodynamics をクリックする。自動的に全解析結果がテーブルに表示される。



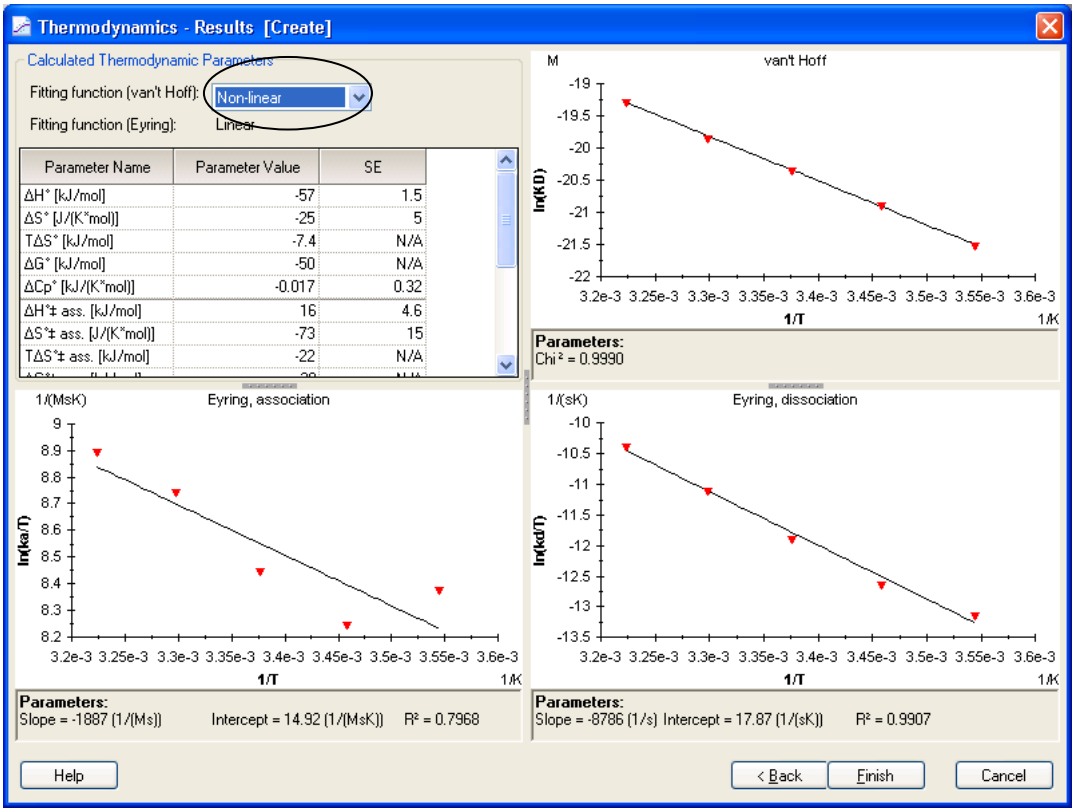
Import をチェックし、Thermodynamics に利用するデータを選択する。**Check All** をクリックするすると、全データが選択される。**Next >**をクリックする。

↓



温度に対する解離定数、反応速度定数のプロットが表示される。**Next >**をクリックする。

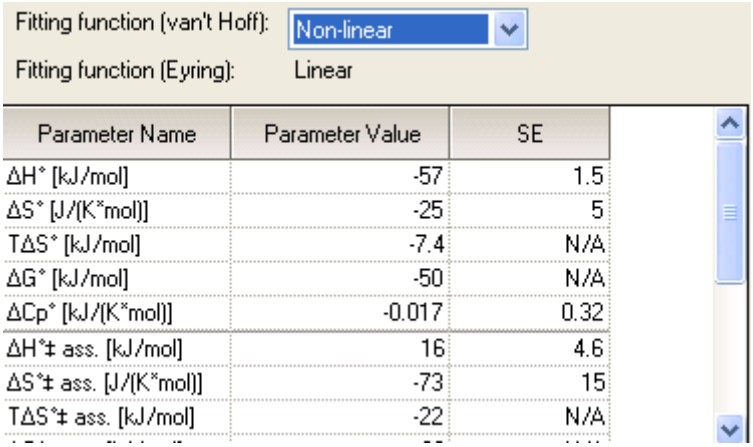
↓



▼から、線形解析（Linear）または非線形解析（Non-linear）を選択する。

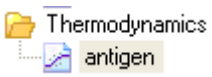
選択した解析手法の結果が表示される。

すべての熱力学的パラメータは、左上のテーブルに表示される。



Finish をクリックする。

上記解析結果は、**Evaluation Explorer** 中の Thermodynamics フォルダに追加される。ファイル名は自動的にサンプル名が採用される。



5-7. 低分子化合物アナライトの相互作用測定

低分子化合物の溶解性の問題で有機溶媒を利用する場合には、一般的なタンパク質-タンパク質相互作用測定と異なり、ランニング緩衝液およびサンプル調製に注意が必要となる。また、測定結果を評価するにあたり溶媒効果の補正が必要となる。

アナライトの調製

アナライト溶液の DMSO の終濃度をランニング緩衝液とあわせる。化合物濃度は結合スクリーニングが目的の場合、親和性にもよるが数十 nM～数 μM で調製する。反応速度定数の算出が目的の場合、K_D（解離定数）値濃度の 1/10～10 倍の濃度範囲で 5 濃度以上調製する。

ランニング緩衝液

PBS や HEPES 緩衝液が広く利用される。HEPES は、ヒト血清アルブミンへの結合が見られるので注意する。

有機溶媒を利用する場合には、DMSO 含有緩衝液を使用することが多い。DMSO 濃度は 5%程度以下を推奨する。DMSO 濃度はリガンドの活性や化合物の溶解性を考慮し決定する。ランニング緩衝液に使用できる DMSO 濃度は 10%までである。

非特異的吸着を抑える目的で、終濃度 0.05%程度の界面活性剤（Surfactant P20 など）を添加することもある。

補足 5-69. ランニング緩衝液調製の注意事項

弊社販売の PBS 10X バッファー（1 x 1000 ml, BR-1006-72）は pH 調製済み。

0.1M phosphate Buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl

⇒超純水で 10 倍希釈後、DMSO を加える。

0.01 M phosphate Buffer, 2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl, 5% DMSO, pH7.4

ランニング緩衝液は用事調製する。

DMSO を扱う際には、耐性材質の容器を使用する。（プラスチック容器は使用不可）

DMSO を含む緩衝液をろ過する際には、フッ素樹脂製またはナイロン製のフィルター（0.22 μm）を用いる。酢酸セルロース製のものは避ける。DMSO 溶液中の混合物も測定に影響をおよぼす場合があるのでグレードの高いもの（UV spectrometry 用等）を使用する。なお、DMSO 混合による pH 変動は大きいため、DMSO 混合後の pH を考慮する。

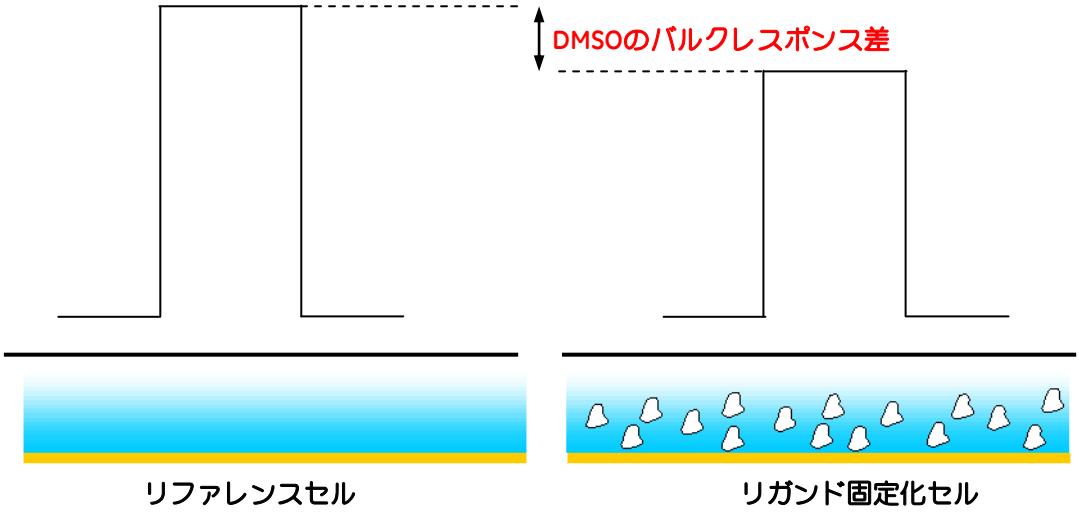
きれいなガラスボトルに保存し、装置にセットする直前までキャップはしっかり閉めておく。装置のボトルポジションにセットする際は必ず付属のスクリューキャップを使用する。

溶媒補正

SPR のシグナルはセンサーチップ表面での様々な屈折率（RI）の変化を反映している。センサーチップ表面での結合反応だけでなく、ランニング緩衝液とサンプルを溶解している溶媒の屈折率の差、すなわち、溶媒（バルク）効果レスポンスが含まれる。

溶媒効果が小さい（100 RU 以下）実験では、リガンド固定化セルからリファレンスセルのレスポンスを差し引くだけでこのバルクレスポンスは排除できる。

しかし、厳密には、リガンド固定化セルに添加した溶液は、リガンド分子の占有体積分排除されるため、リファレンスセルのバルクレスポンスは、リガンド固定化セルよりも高くなる。



ランニング緩衝液とアナライト溶液中の DMSO 濃度 1%の違いは約 1,500 RU のバルクレスポンスに相当する。複数あるサンプルを個々に調製する際、DMSO 濃度の誤差が無視できないバルクレスポンスの差を生む可能性がある。

このように、溶媒効果が大きい DMSO を用いる実験では、単純に差し引くだけではバルクレスポンスの差を十分に排除することはできない。実際、このバルクレスポンスの差は小さい（通常 10 RU 以下）が、低分子化合物が結合した際に得られる結合レスポンスと同程度であるため、バルクの差を補正する必要がある。

溶媒補正は以下の 3 つの要因が重複した際必要となる。

- 期待されるアナライトの結合レスポンスが小さい（100 RU 以下）場合
- リガンドを高密度（10,000 RU 以上）に固定化した場合
- サンプル溶液に DMSO が含まれるなど、バルクレスポンスが大きく（3000 RU 以上）、サンプル間で値が異なる場合（DMSO 濃度の“誤差”も含めて）

補足 5-70. 溶媒補正の方法

溶媒補正の手順

Biacore T100 Evaluation Software では以下の補正を自動でおこなう。

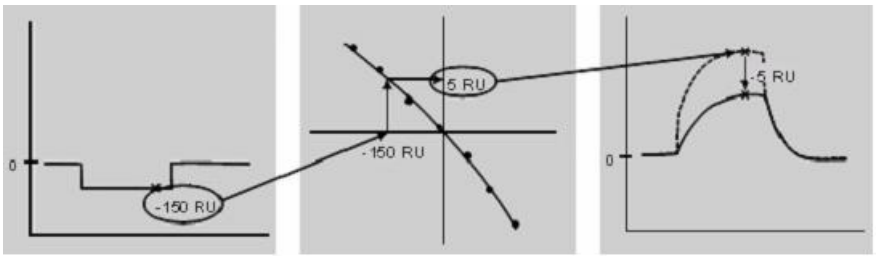
測定の際に、DMSO 溶液の濃度シリーズ（ランニング緩衝液に含まれる DMSO 濃度±1 %程度）を、リガンド固定化セルおよびリファレンスセルに添加し、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を記録する。

リファレンスセルのレスポンスを x 軸、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を y 軸にプロットして溶媒補正用曲線を作成する。

低分子化合物を添加した際、リファレンスセルのレスポンス（図①）を溶媒補正用曲線に代入して、補正値を算出する（図②）。

相互作用測定で得られた結合レスポンスから補正値を差し引く（図③）。

①　②　③



溶媒補正用 DMSO 溶液の調製例

5 % DMSO 含有サンプルを用いる場合の溶媒補正用 DMSO 溶液の作成方法を記載する。

すべての DMSO 溶液は用事調製する。

①1x PBS（no DMSO）を調製する。

②溶媒補正用曲線 4 %、6% DMSO ストック溶液を調製する。

4% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9600 µl
	100 % DMSO	400 µl
		10000 µl
6% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9400 µl
	100 % DMSO	600 µl
		10000 µl

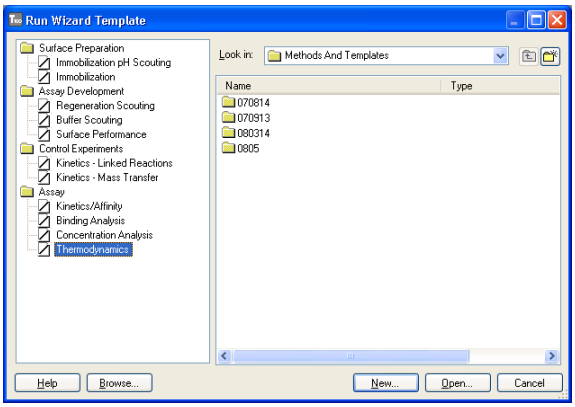
③ストック溶液を下記表の割合で混合して、4 %～6 %の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する。

以下の表は 8 段階の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する際のプロトコールである。

4% DMSO		100	200	300	400	500	600	700
6% DMSO	700	600	500	400	300	200	100	
	700	700	700	700	700	700	700	700 (µl)

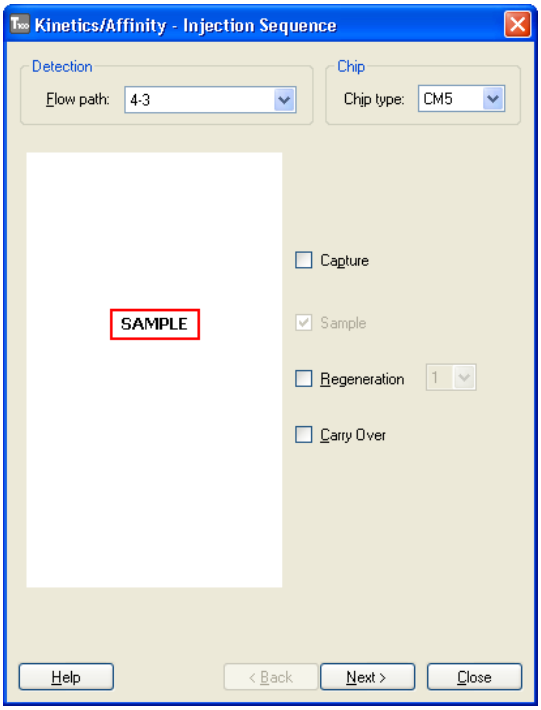
5-7-1. プログラムの実行

Toolbar の **Run Wizard** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard...**をクリックする。



Assay → **Kinetics/Affinity** を選択した後、**New...**をクリックする。以前にプログラムを **Methods and Templates** フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映される。同じプログラムを実行したい場合は、**Open...**をクリックする。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse...**をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open...**をクリックする。

↓



1 サイクル分の測定シークエンスを設定する。

Detection

Flow path　測定をおこなうフローセルを設定する。
基本的にリファレンスの差し引き機能を利用するのが望ましい。なお、キャプチャー法を利用する場合、差し引き機能として 2-1 または 4-3 の選択のみとなる。

Chip

Chip type　利用するセンサーチップを選択する。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドをトラップする場合にチェックを入れる。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされる。補足 5-76 参照。

Sample

アナライトの添加

Regeneration

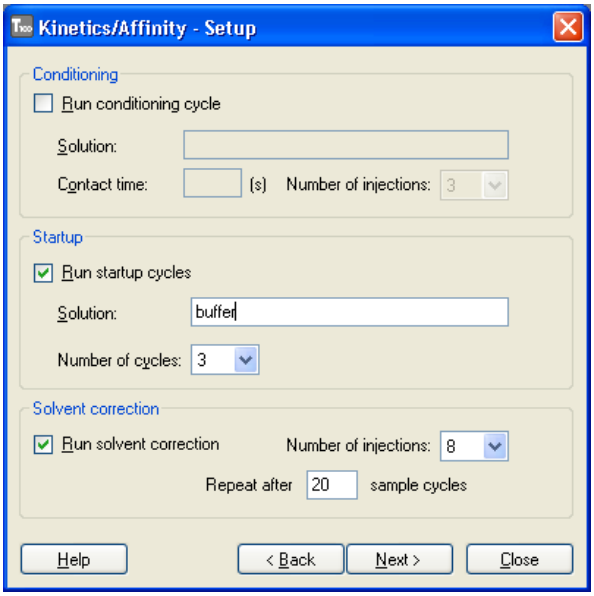
再生が必要な場合にチェックを入れる。添加回数 1 回または 2 回。

Carry Over

アナライトのキャリーオーバーの確認をおこないたい場合にチェックを入れる。

Next >をクリックする。

↓



Conditioning

Solution　再生溶液または緩衝液の名称

contact time　添加時間（s）

Number of injections　添加回数

Startup

Solution　指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施する。通常は、ランニング緩衝液を用いる。

Number of cycles　サイクル数。3 回以上を推奨する。

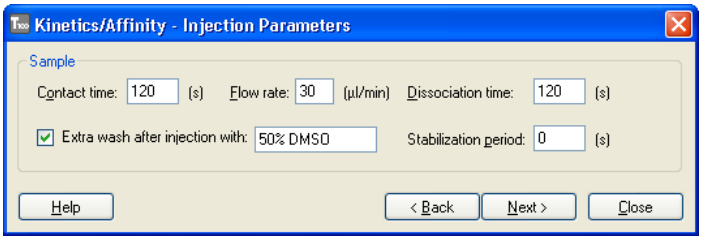
Solvent correction

溶媒補正をおこなう場合にチェックを入れる。

Number of injections　溶媒補正の測定点を選択する。何サンプルごとに溶媒補正を実施するかを、"Repeat after ☐ Sample cycles"で指定する。

Next >をクリックする。

↓



Sample

contact time	アナライトの添加時間	120 s
Flow rate	流速	30 µl/min
Dissociation time	解離時間	120 s

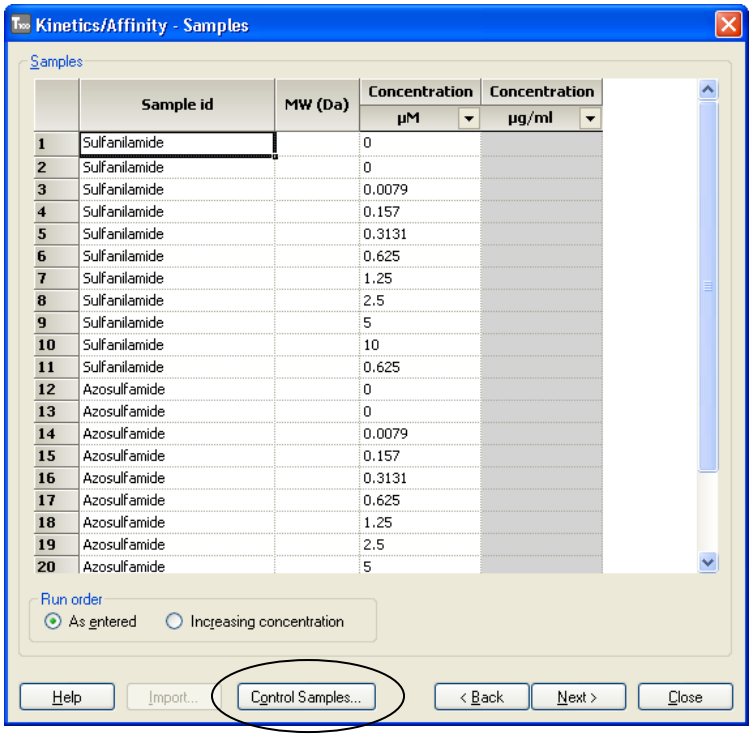
Extra wash after injection with

アナライト添加後に指定した溶液で、フローセル以外の流路を洗浄したい場合にチェックを入れる。センサーチップ表面には流れない。

Stabilization period　添加後のベースライン安定化時間　0 s
（必要に応じて設定する。）

入力後、**Next >**をクリックする。

↓

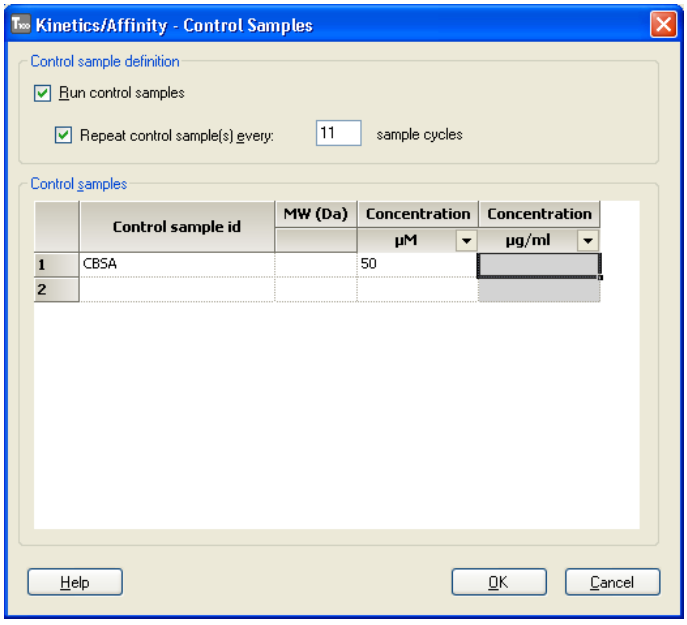


Sample id　　アナライトの名称

MW　(Da)　　アナライトの分子量

Concentration　　アナライトの濃度（単位も選択）
分子量と濃度を入力すると、自動的に“モル濃度 nM ”と“重量濃度 µg/ml”を換算する。

コントロールサンプルを定期的に添加する場合は、**Control Samples...**をクリックする。



Control Sample definition

コントロールサンプルを測定する場合に **Run control Samples** にチェックを入れる。

Repeat control Sample（s）　every　チェックを入れて、何サンプルごとにコントロールサンプルを測定するか指定する。

Control Samples

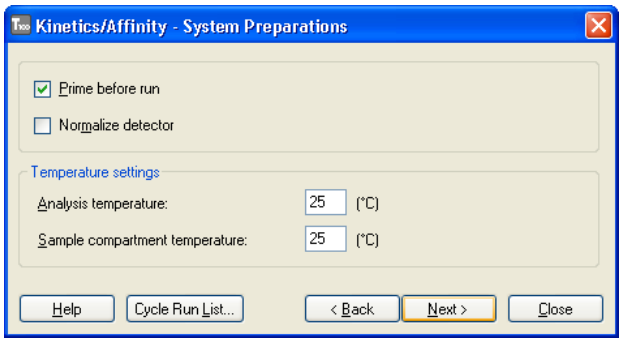
テーブルにコントロールサンプルの情報を入力する。

入力後、**Next >**をクリックする。

補足 5-71. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

↓



測定を始める前の **Prime** および **Normalize** の実施を選択する。

Temperature settings

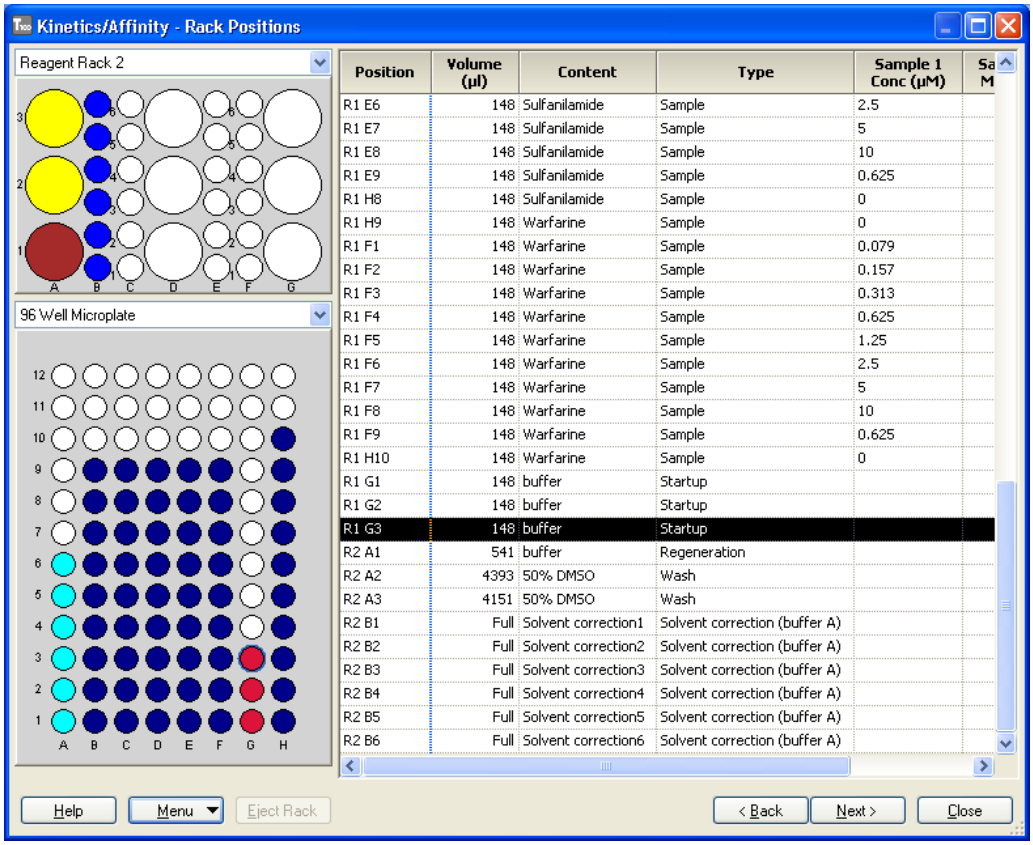
Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

Cycle Run List...をクリックすると、測定サイクルのリストが表示される。

Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 Conc (µM)	Sample 1 MW (Da)
1	Startup	buffer		
2	Startup	buffer		
3	Startup	buffer		
4	Solvent correction			
5	Control Sample	CBSA	50	
6	Sample	Sulfanilamide	0	
7	Sample	Sulfanilamide	0	
8	Sample	Sulfanilamide	0.0079	
9	Sample	Sulfanilamide	0.157	
10	Sample	Sulfanilamide	0.3131	
11	Sample	Sulfanilamide	0.625	
12	Sample	Sulfanilamide	1.25	
13	Sample	Sulfanilamide	2.5	
14	Sample	Sulfanilamide	5	
15	Sample	Sulfanilamide	10	
16	Sample	Sulfanilamide	0.625	

Next をクリックする。

↓



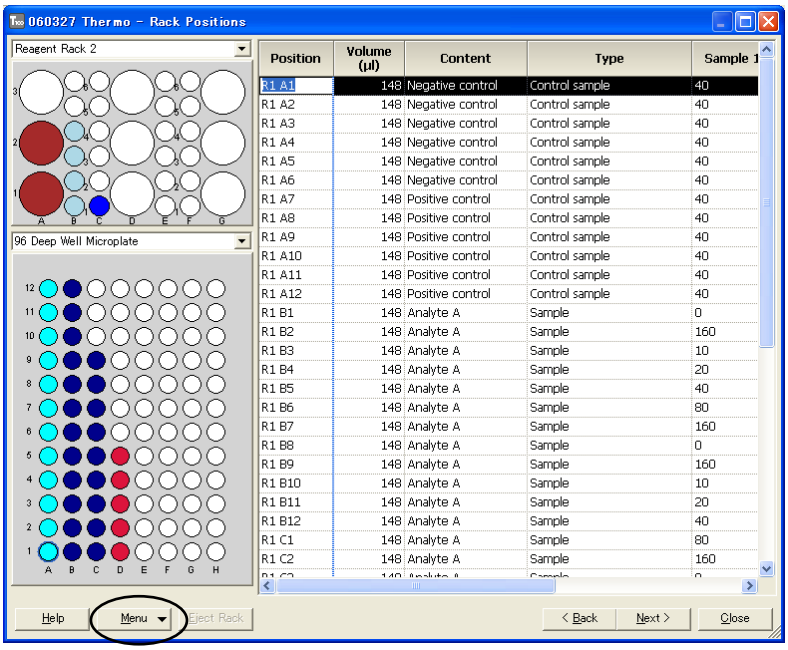
右側の表でサンプルの位置と容量（µl）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 5-72. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu** → **Export Positions...** を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu** → **Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

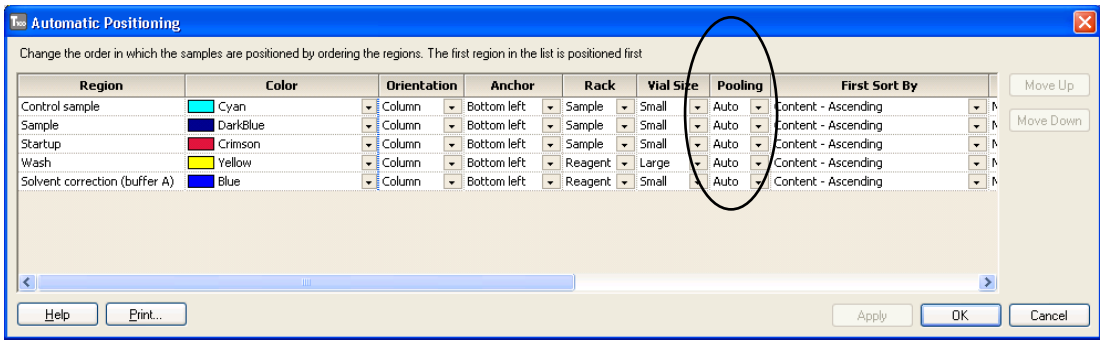
補足 5-73. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される。）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu から Automatic Positioning...を選ぶ。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定をおこなうことができる。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっている。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックする。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

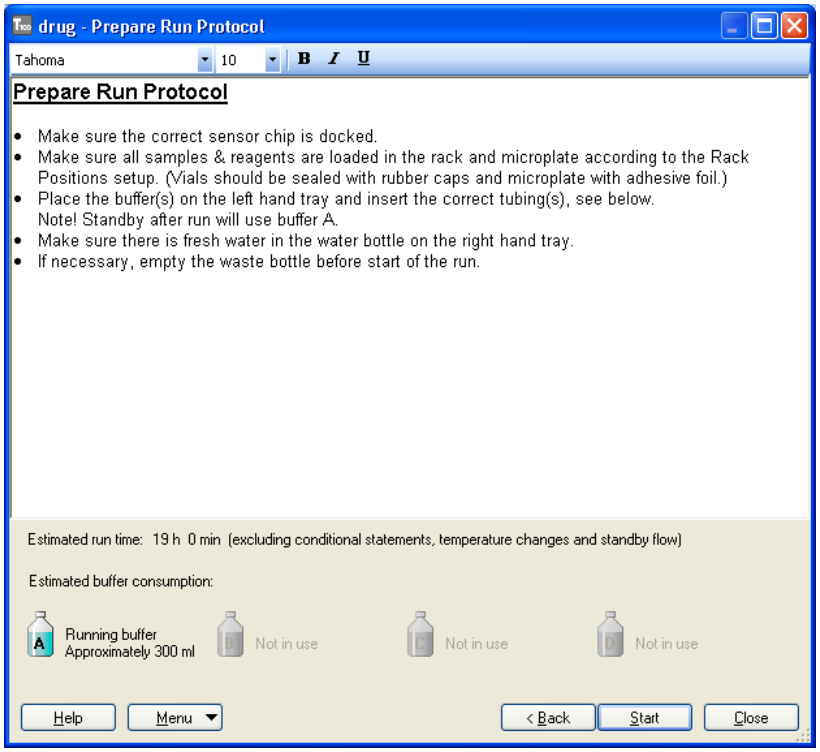
Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックする。

↓


drug - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 19 h 0 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
Approximately 300 ml
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

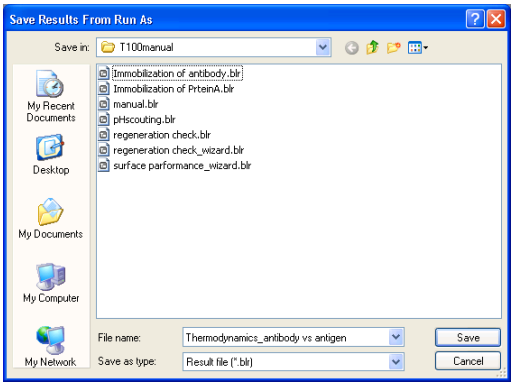
基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示される。

Start をクリックする。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

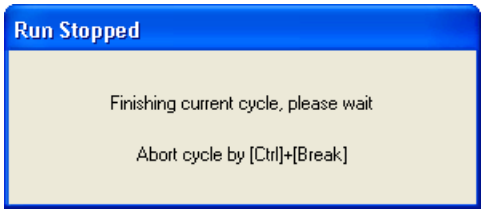
測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動する。

補足 5-74. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。

ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

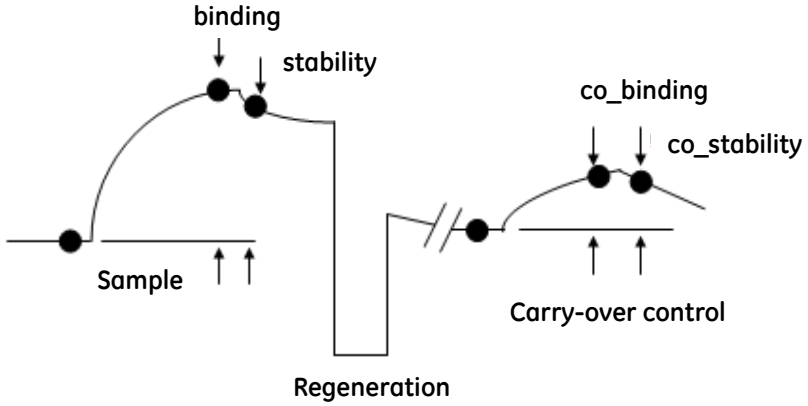
↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

補足 5-75. レポートポイントの設定

溶媒（バルク）補正を必要とする実験では、低分子アナライトのバルクレスポンスを測定するために、アナライト添加中（添加終了直前）にレポートポイントを取得する必要がある。自動取得されるレポートポイントの名前は binding と付いている。添加終了直後のレポートポイントは stability として取得される。また、低分子アナライト特有のニードル、流路等へのキャリーオーバーチェックのために、アナライト添加終了後、ランニング緩衝液をアナライトと同等のモードで添加する際に取得されるレポートポイントの名前は、頭に co- が付けられている。



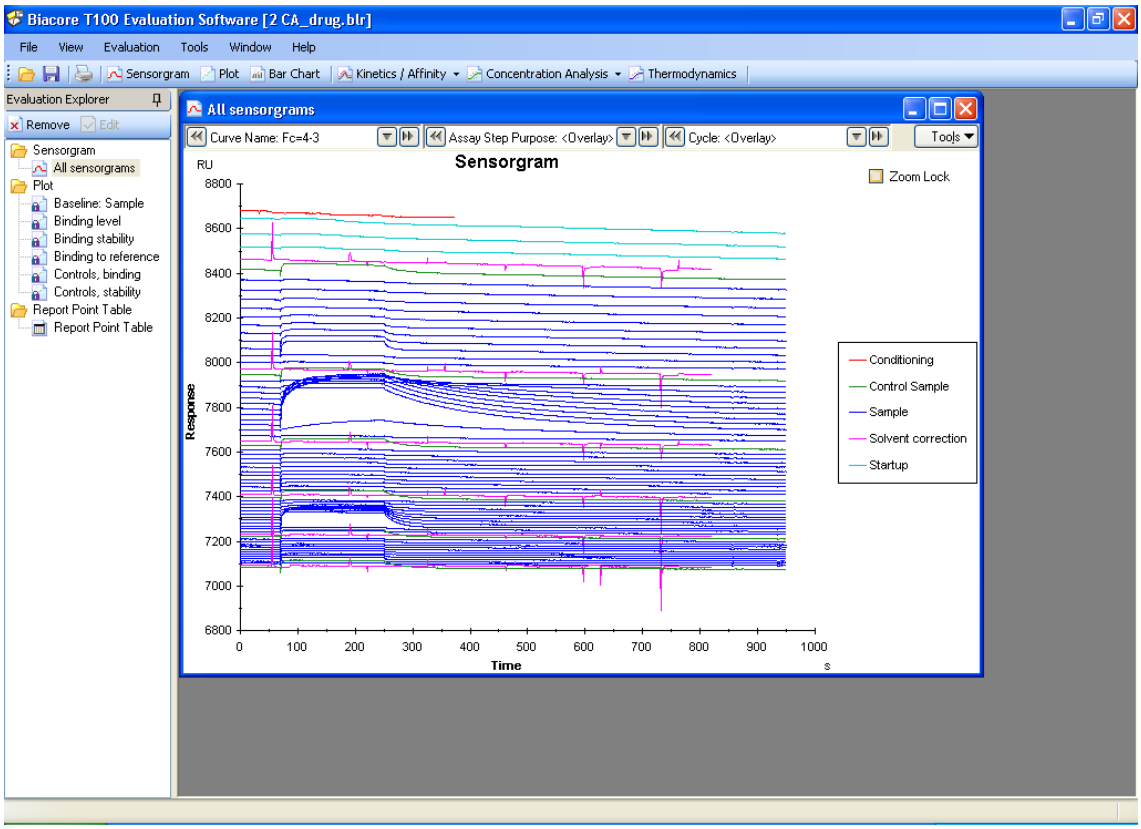
補足 5-76. キャプチャー法を利用した低分子化合物の測定

Wizard の Binding analysis および Kinetics / Affinity では、溶媒補正曲線の測定を、リガンドをキャプチャーせずに実施する。リガンドキャプチャー後のベースラインドリフトが小さく、一度リガンドをキャプチャーした表面で連続してアナライトの測定を実施する場合には、Wizard のキャプチャー機能を利用した測定が実施できる。

ただし、キャプチャー後のベースラインドリフトが大きく、アナライトごとにリガンドのキャプチャーをおこなう場合は、溶媒補正曲線の測定はリガンドキャプチャー後の表面でおこなうことが望ましい。この際、測定プログラムはメソッドで作成する必要がある。メソッド作成については、6 章を参照。

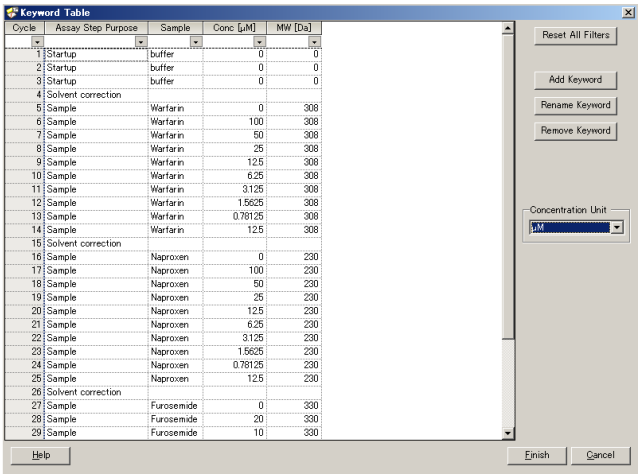
5-7-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行される。(反応速度定数・解離定数算出は、溶媒補正を実施後、5-1. 反応速度定数・解離定数の算出を参照して解析をおこなう。)

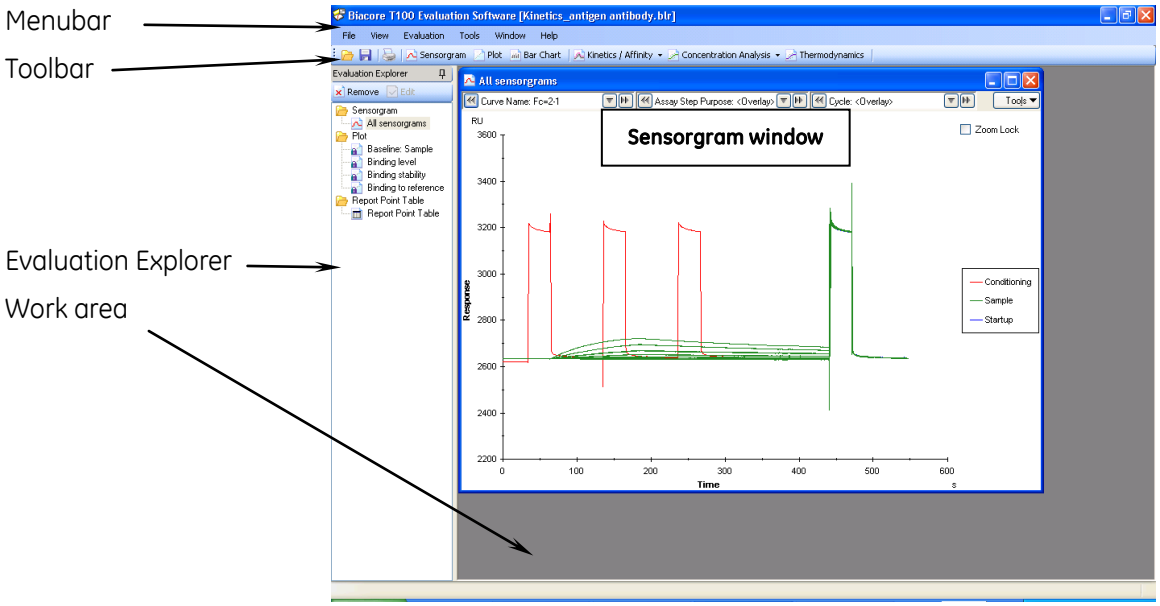


補足 5-77. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、**Keyword table...**で変更する。**Tools...** → **Keyword Table...**をクリックする。



補足 5-78. 画面の説明

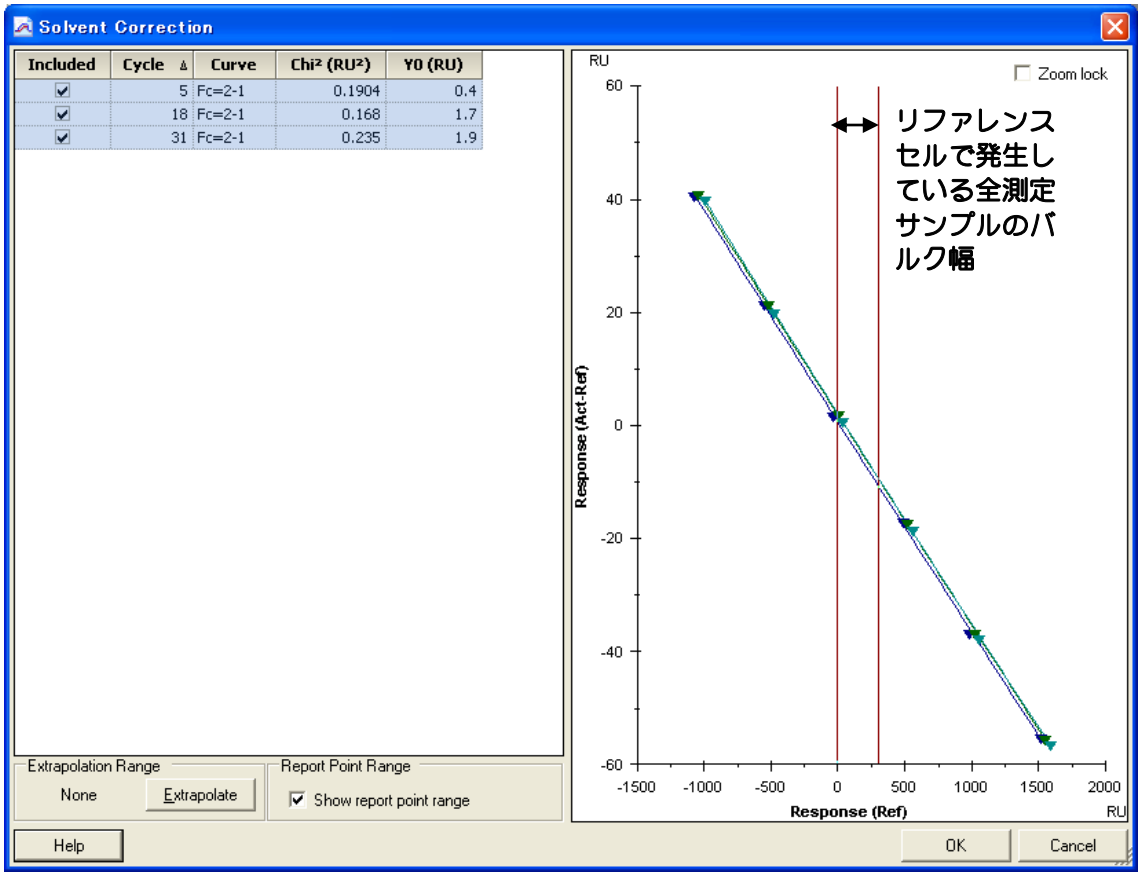


Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

溶媒補正

Evaluation → Add Solvent correction...をクリックする。

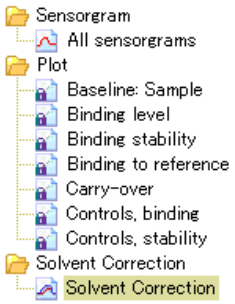
測定サイクル中の溶媒補正用曲線が表示される。



テーブルで利用する補正曲線にチェックを入れる。

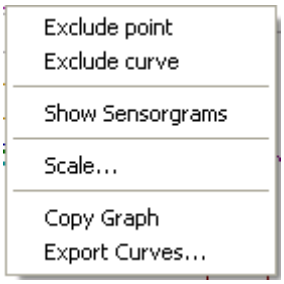
OK をクリックすると補正が完了する。

溶媒補正用曲線は、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存される。



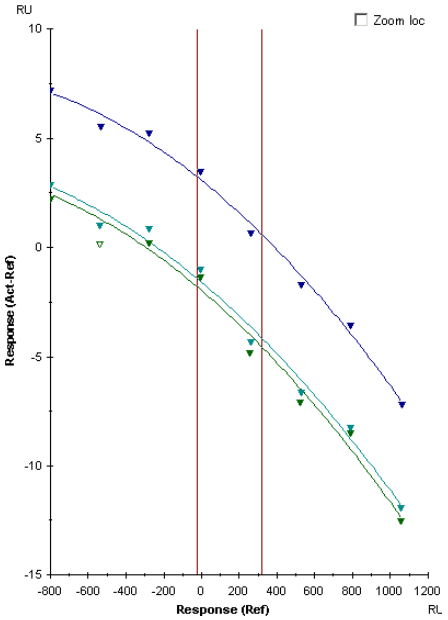
補足 5-79. 測定ポイントの削除

エアーの混入などの理由で、溶媒補正用曲線から削除したい測定ポイントがある場合は、その測定ポイント上にカーソルを移動し、マウスを右クリックする。



Exclude point をクリックする。

↓



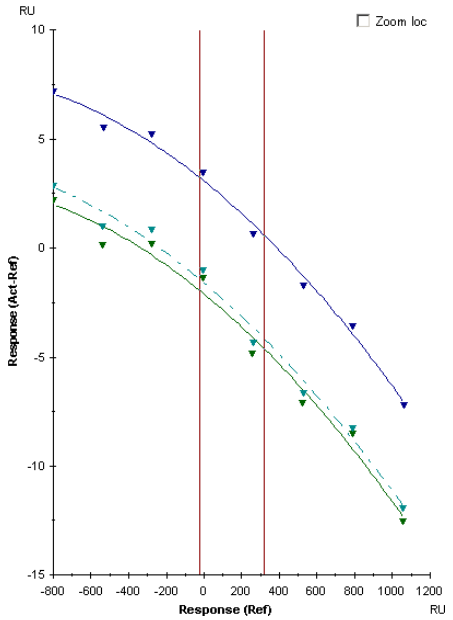
測定ポイントが削除される。同時に、改めて残りの測定ポイントで溶媒補正用曲線が作成される。

補足 5-80. 溶媒補正用曲線の削除

エアーの添加などの理由で解析から削除したい溶媒補正用曲線がある場合、目的の溶媒補正用曲線について、**Solvent correction** 左のボックスの **Include** カラムのチェックを外す。

Included	Cycle	Curve	Chi² (RU²)	Y0 (RU)
☑	4	Fc=4-3	0.2299	3.1
☑	25	Fc=4-3	0.5779	-2.1
☐	30	Fc=4-3	0.4273	-1.6

↓



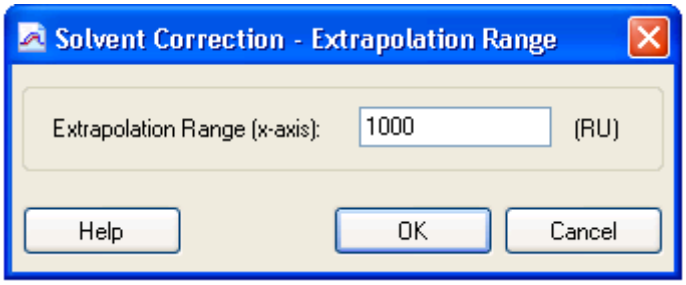
溶媒補正用曲線は削除される。

補足 5-81. 溶媒補正用曲線の延長

サンプルもしくは溶媒補正用 DMSO 溶液の調製の問題で、測定サンプルのバルクレスポンスが溶媒補正用 DMSO 溶液の範囲内に収まらなかった場合に、溶媒補正用 DMSO 溶液の濃度幅（＝リファレンスセルに対するバルク幅）を広げることができる。ただし、延長された溶媒補正用曲線の領域での補正は、実測値とは異なるため、最終結果には注意が必要である。

Solvent correction 左下の **Extrapolate** をクリックする。

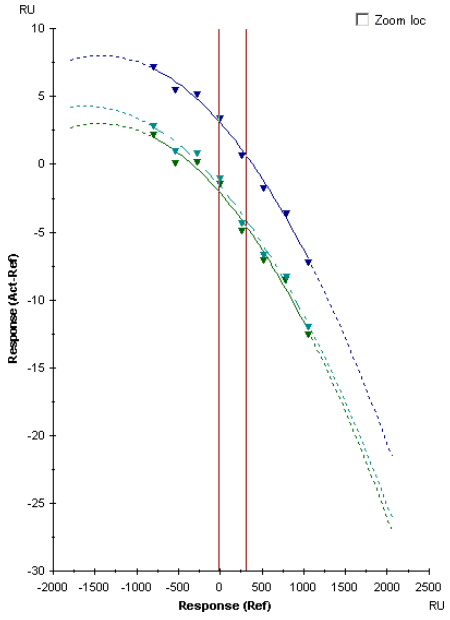
↓



延長する幅を入力する。実際の溶媒補正用曲線の測定幅の 10%を超えないことが望ましい。

OK をクリックする。

↓



データの評価

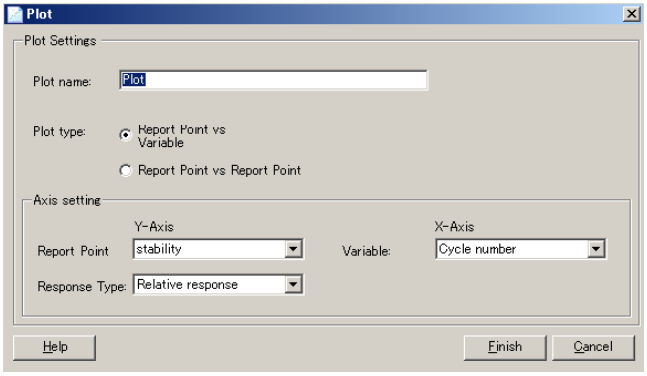
ヒット化合物のランキング評価は、5-5. 結合の有無の確認、スクリーニングを参照する。低分子化合物アナライトの場合、化合物の分子量差の影響が大きいため、分子量補正をすることにより、真の結合の強さを評価する。以下に、分子量補正の方法を記載する。（反応速度定数・解離定数算出は、5-1. 反応速度定数・解離定数の算出　マルチサイクル法を参照する。）

分子量補正

結合レスポンスを分子量で割り、さらに 100 を掛けた値が補正値である。

Evaluation → Add Plot...をクリックする。

↓

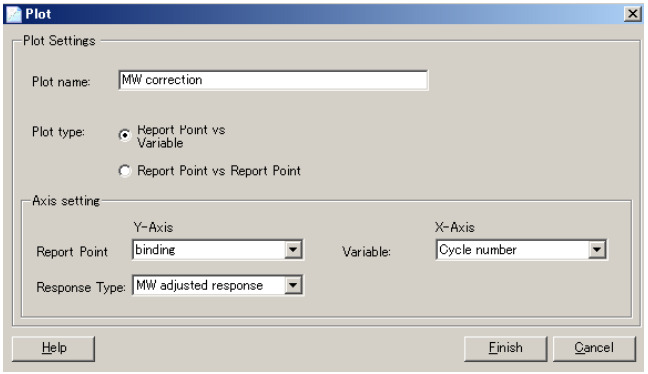


Plot name　プロットデータの名称（例；MW correction）

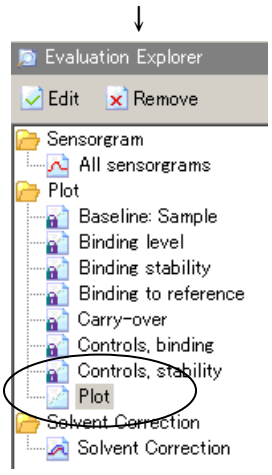
Plot type　プロット様式の設定（Report Point vs Variable）

Axis setting　Y 軸の設定（Report Point：binding、Response type：MW adjustedresponse）

X 軸の設定（Variable：Cycle number）

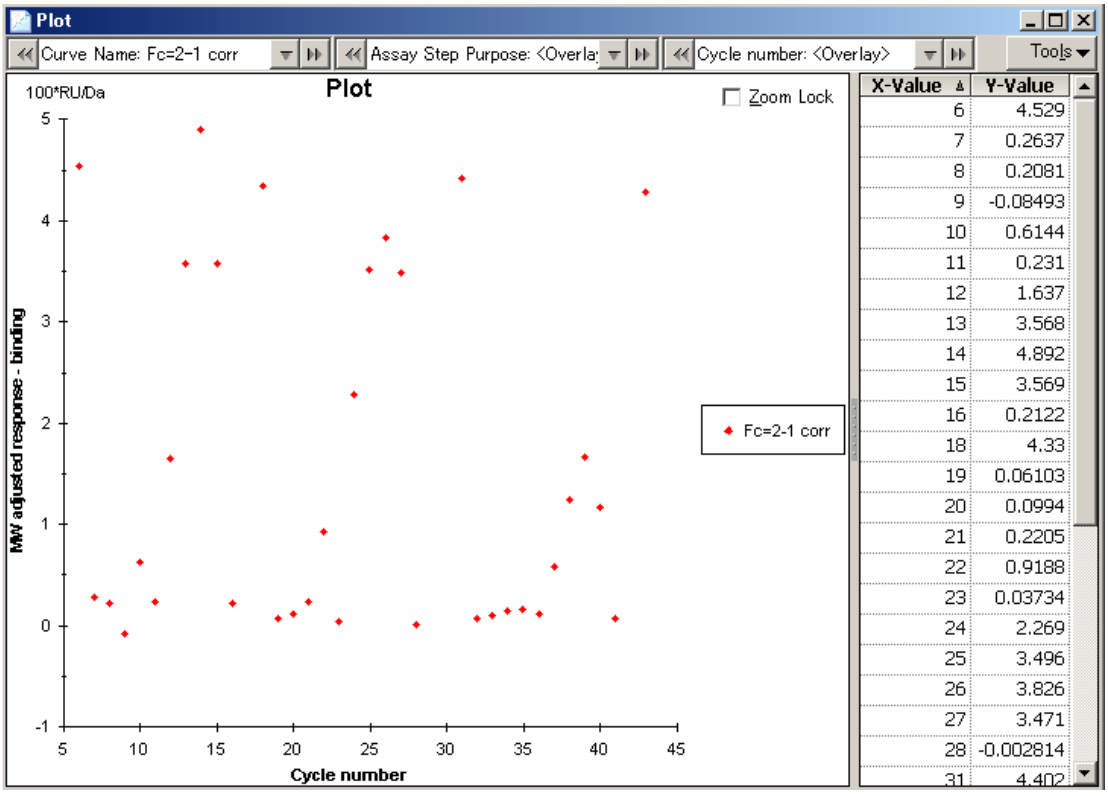


Finish をクリックする。



Evaluation Explorer の **Plot** フォルダに反映される。
ファイル名は、自動で Plot と入力されるので、任意で変更する。

Work area には、分子量補正されたデータが表示される。
Y 軸の単位は、100×RU/Da に変更する。



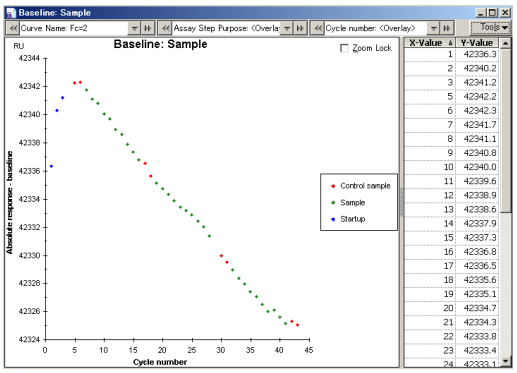
評価の詳細は、5-5. 結合の有無の確認、スクリーニングを参照する。

補足 5-82. 測定結果の正当性の評価

Evaluation Explorer の Plot を用いて、得られたデータの信頼性があるかどうかを評価する。

ベースラインの変動

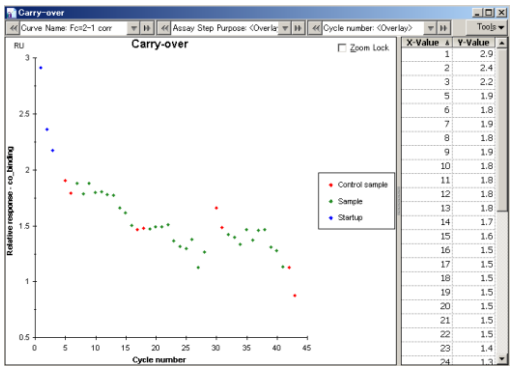
Baseline: Sample プロット



全測定サイクルの baseline の絶対値に対するプロットが表示される。物理吸着しているリガンドがサイクルごとに脱離している場合、右肩下がりになるが、ポジティブコントロールサンプルのレスポンスが確認できていれば良い。ポジティブコントロールがない場合、全サイクルの総変動量（RU）が固定化量の 10%以上である場合には、それを考慮して評価する必要がある。

キャリーオーバーチェック

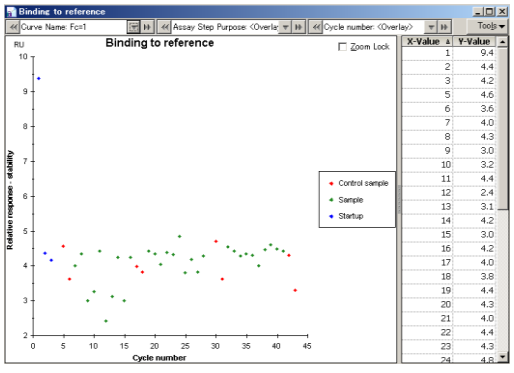
Carry-Over プロット



co_binding の co_baseline に対する相対値プロットが表示される。ランニング緩衝液のレスポンス（画面では Startup サイクル）に対して、レスポンスの大きいアナライトはニードルや流路等に吸着する性質を持つ。キャリーオーバーが激しいアナライトの次のサイクルの結合レスポンスは、それを考慮して評価する必要がある。

リファレンスセルへの非特異吸着の確認

Binding to reference プロット



Stability の baseline に対する相対値のプロットが表示される。ランニング緩衝液のレスポンスを基準として評価する。ランニング緩衝液のレスポンス以上のサンプルは、センサーチップ表面へ非特異的に吸着している。それを考慮した上で評価をおこなう。

5-8. 結合アナライトの回収

固定化したリガンドに対して結合したアナライトを回収する。再生溶液を添加し、溶出されたアナライトを引き戻すようにして指定したバイアルに回収する。1 回の回収容量はおよそ 2 ul である。効率よく回収をおこなうためには、アナライトの添加条件と回収溶液の条件が重要となる。

アナライトの添加条件

できるだけ高濃度のアナライトを用いる方が、1 度の添加でより効率よくアナライトを回収することができる。特に低親和性の結合ではアナライト濃度が回収率に大きく影響する。血清等のアナライトの添加では、センサーチップ表面へ非特異的吸着が生じやすく、目的分子以外の分子も回収される。このような場合には、希釈倍率をあげて非特異的吸着を低減させるなどの検討が必要となる。また、1 度に回収される量は微量であるため、結合量から、何回程度繰り返し結合回収が必要か確認する必要がある。

回収溶液

再生溶液が回収溶液となる。再生できなければ、アナライトを回収することができないので、あらかじめ、マニュアル測定で再生条件を検討する。回収溶液（再生溶液）の種類は、補足 4-1. 再生溶液の種類を参考にする。

質量分析に回収サンプルを直接持ち込む場合は、サンプルを酸性化することが必要である。低濃度の酸は、結合したアナライトを再生するのに適している場合が多く、回収溶液に 0.5% TFA や 0.1% 酢酸を利用すれば、回収サンプル溶液を直接質量分析で解析することができる。質量分析の前に ZipTip（Milipore）などのマイクロ逆相カラムで精製をおこなう場合には、回収溶液として、アルカリ溶液（50 mM NaOH など）も使用できる。

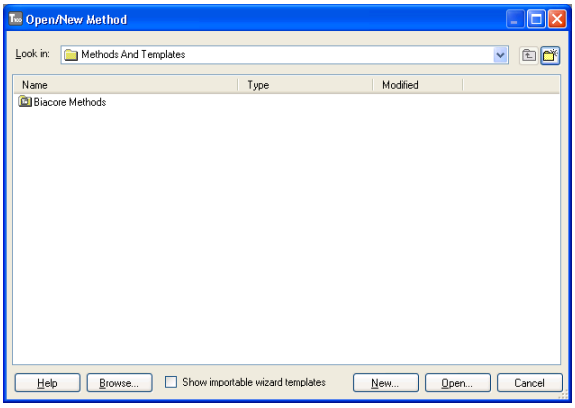
回収前の洗浄溶液

相互作用測定時の緩衝液には、質量分析を阻害する成分（例；NaCl、Surfactant P20、DMSO、リン酸緩衝液など）が多く含まれている。回収サンプル溶液中への、これらの成分の混入を抑えるために、アナライト添加直前にセンサー表面や流路を洗う操作がおこなわれる。その洗浄溶液として、炭酸水素アンモニウムなどの揮発性の緩衝液が用いられる。

5-8-1. プログラムの実行

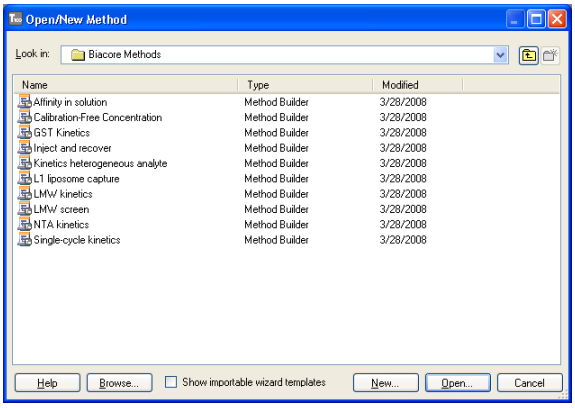
Toolbar の **Run Method** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Method...**をクリックする。

↓



Biacore Methods をダブルクリックする。

↓

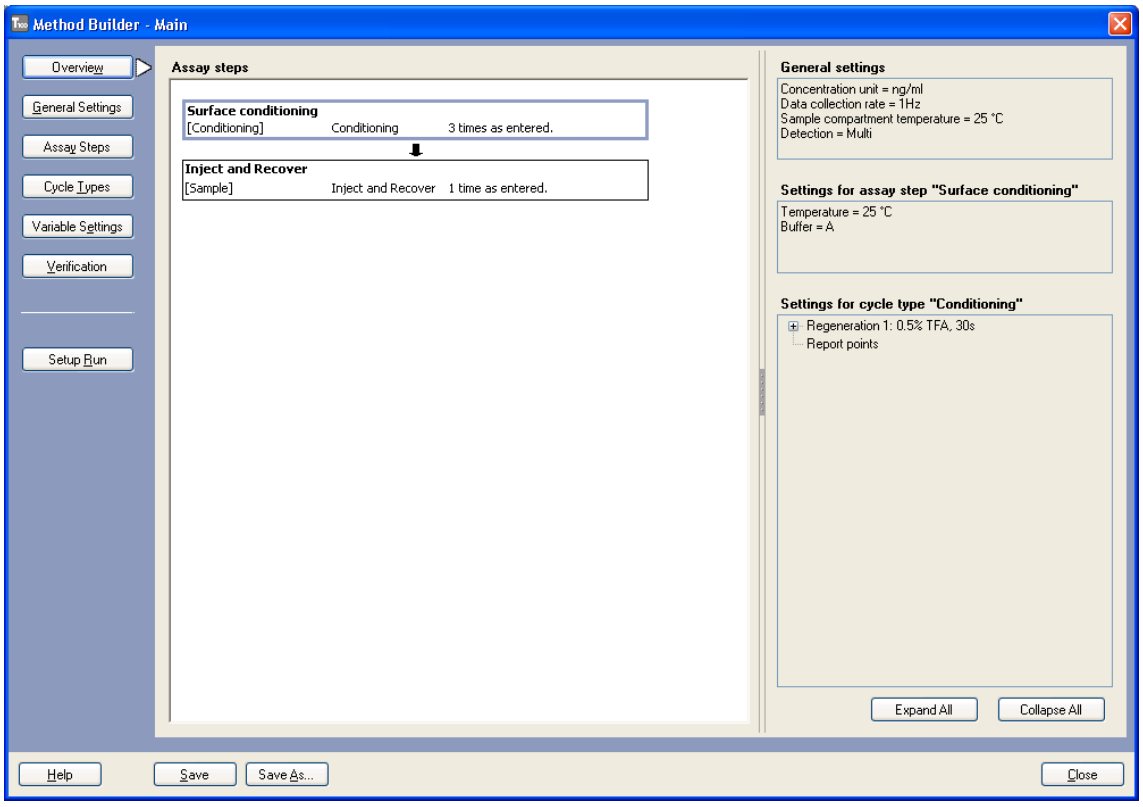


Inject and recover をハイライトにし、**Open...**をクリックする。

↓

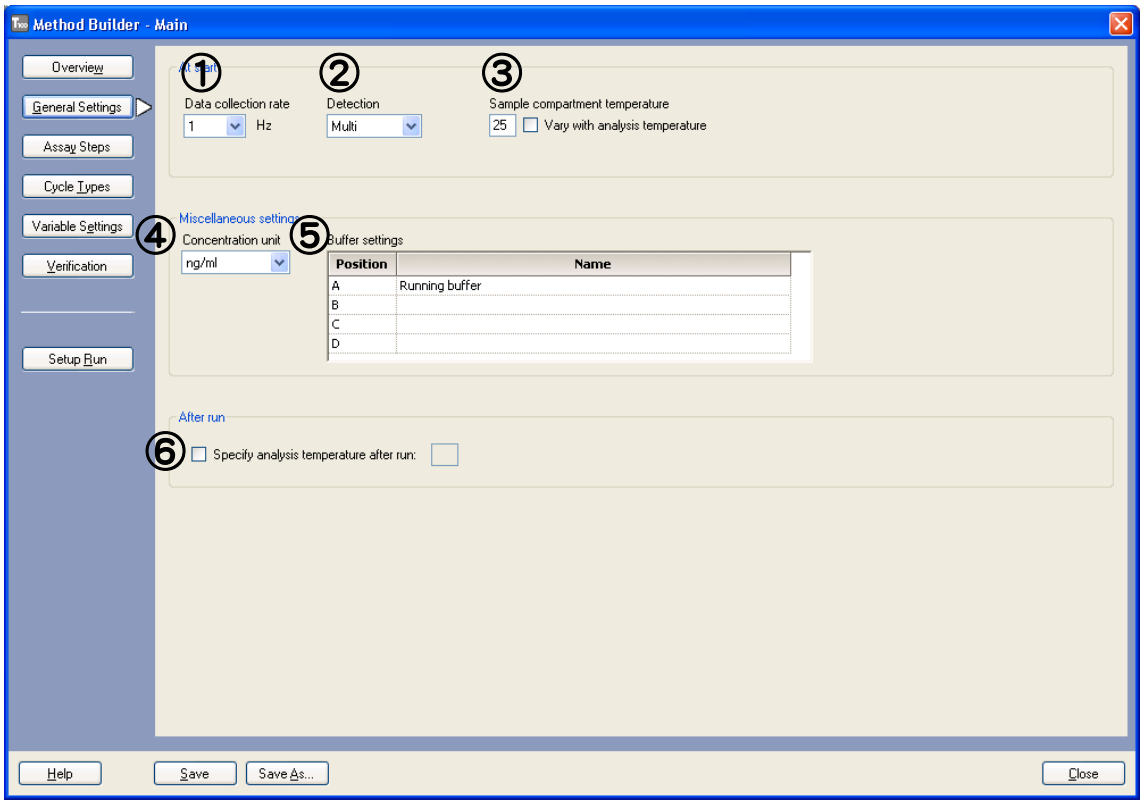
Method Builder の **Main** ダイアログが表示される。

Overview 画面にはメソッド全体の設定項目が表示される。以下に変更項目について記載する。詳細は 6 章を参照。



General settings をクリックする。

↓



① **Data Collection rate**

1Hz を選択。

② **Detection**

Multi を選択。設定の変更不可。1、2、3、4 に流れる。

③ **Sample compartment temperature**

サンプルコンパートメントの温度（4～45℃）を設定。通常は、25℃。

④ **Concentration unit**

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択。

⑤ **Buffer settings**

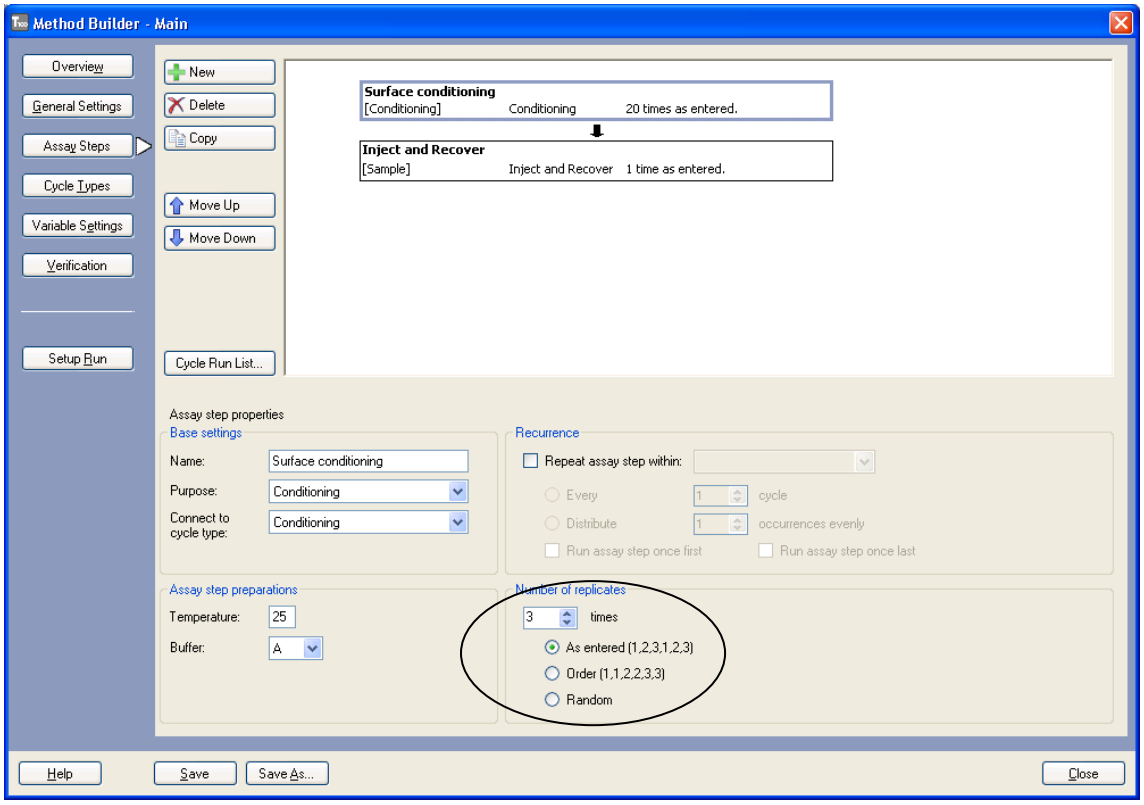
使用するランニング緩衝液名を入力。

⑥ **After run**

チェックを入れておくと、全測定が終了した後にセンサー表面の温度が指定した温度に自動変更される。

設定後、**Assay Steps** をクリックする。

↓



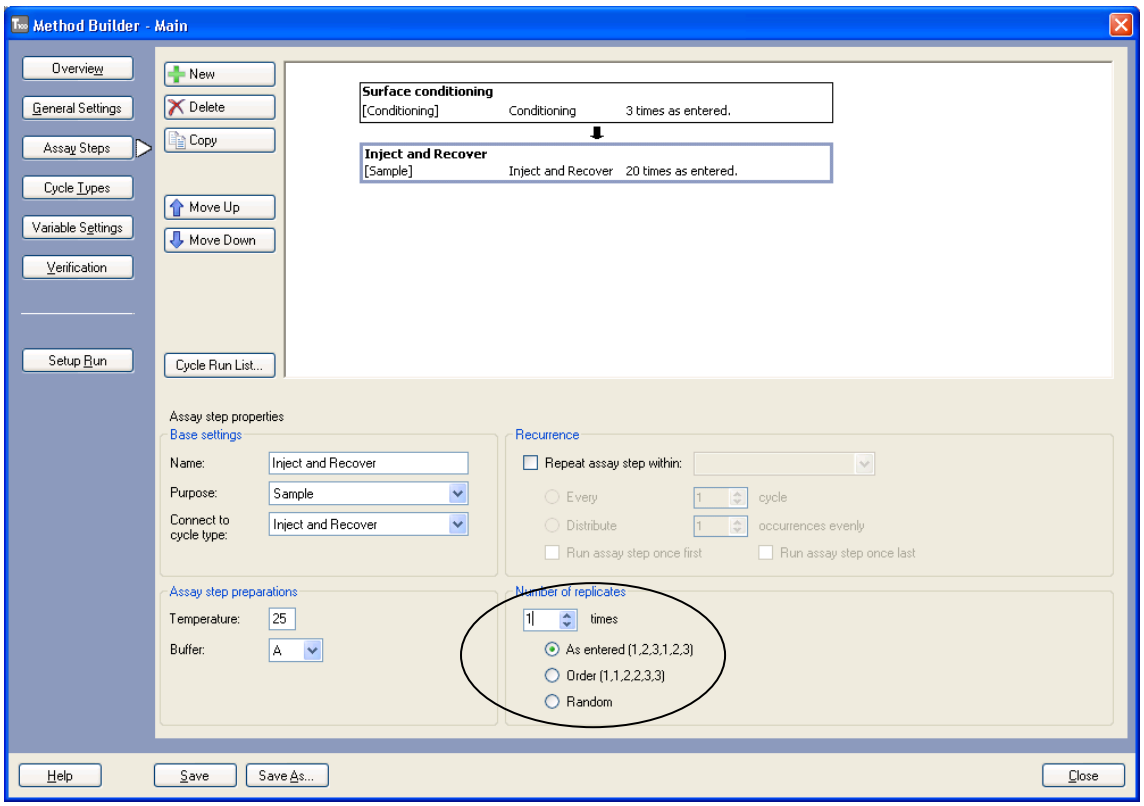
Number of replicates

Times　　スタートアップの測定回数を指定する。3 回以上を推奨。

↓

Injection and Recover をクリックする。

↓



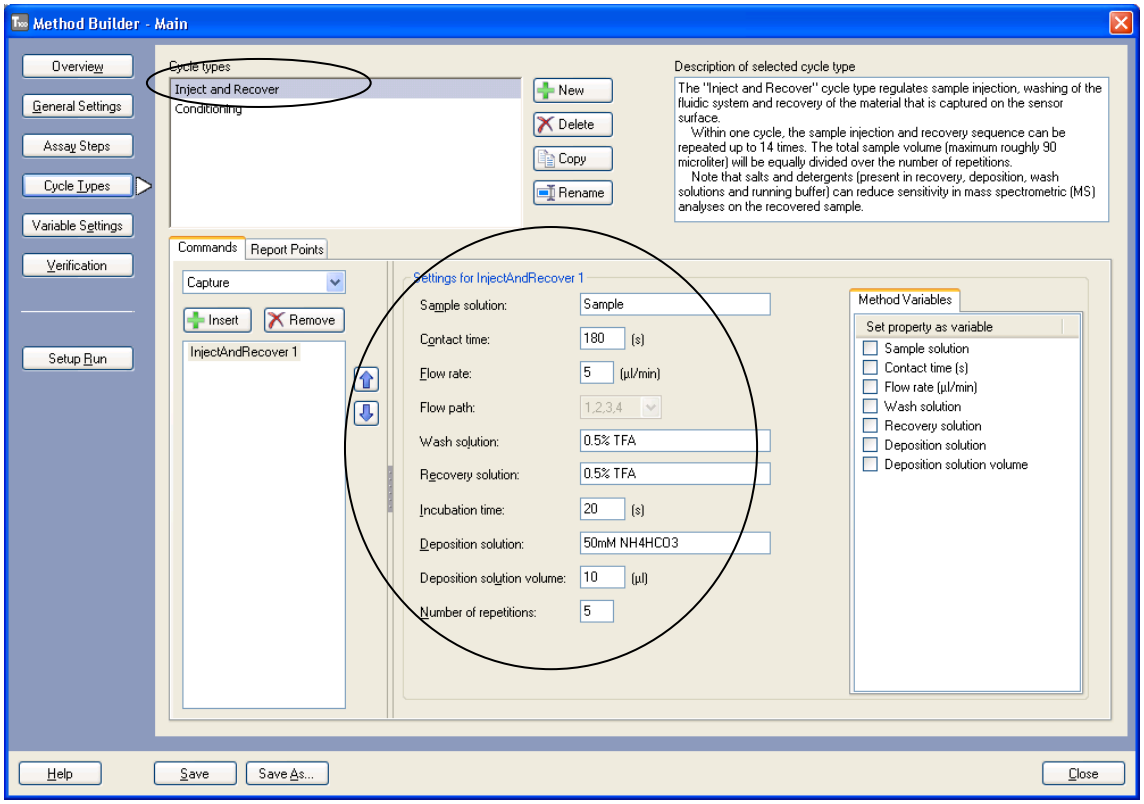
Number of replicates

Times　　回収サイクルの実施回数を入力する。

Cycle Types をクリックし、次画面に移動する。

↓

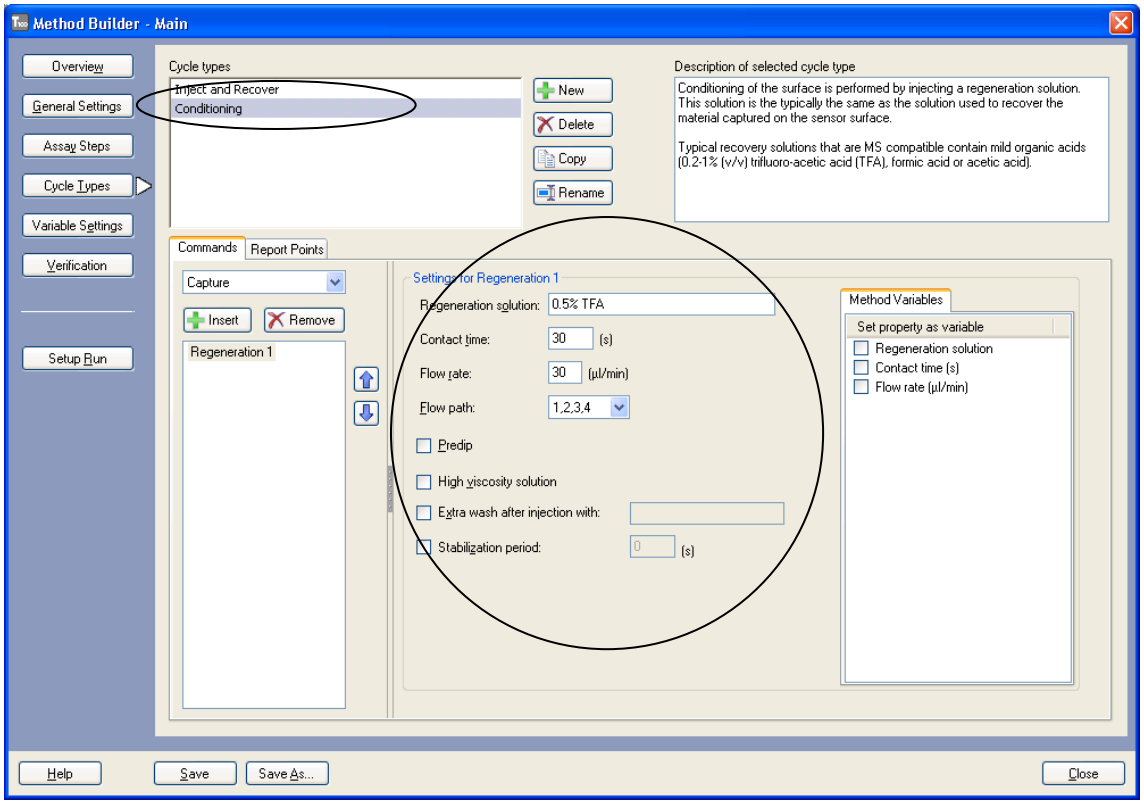
Inject and Recover をクリックする。


Method Builder - Main
Overview
General Settings
Assay Steps
Cycle Types
Variable Settings
Verification
Setup Run
Cycle types
Inject and Recover
Conditioning
New
Delete
Copy
Rename
Description of selected cycle type
The "Inject and Recover" cycle type regulates sample injection, washing of the fluidic system and recovery of the material that is captured on the sensor surface.
Within one cycle, the sample injection and recovery sequence can be repeated up to 14 times. The total sample volume (maximum roughly 90 microliter) will be equally divided over the number of repetitions.
Note that salts and detergents (present in recovery, deposition, wash solutions and running buffer) can reduce sensitivity in mass spectrometric (MS) analyses on the recovered sample.
Commands
Report Points
Capture
Insert
Remove
InjectAndRecover 1
Settings for InjectAndRecover 1
Sample solution: Sample
Contact time: 180 (s)
Flow rate: 5 (µl/min)
Flow path: 1,2,3,4
Wash solution: 0.5% TFA
Recovery solution: 0.5% TFA
Incubation time: 20 (s)
Deposition solution: 50mM NH4HCO3
Deposition solution volume: 10 (µl)
Number of repetitions: 5
Method Variables
Set property as variable
Sample solution
Contact time (s)
Flow rate (µl/min)
Wash solution
Recovery solution
Deposition solution
Deposition solution volume
Help
Save
Save As...
Close

Sample solution	アナライトの名称
contact time	アナライト添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Flow path	1, 2, 3, 4。変更不可。
Wash solution	アナライト添加前のフローシステムの洗浄溶液
Recovery solution	マニュアル測定で条件検討した再生溶液を入力する。回収溶液は、ランニング緩衝液との希釈を防ぐためにエアーセグメントをはさんでフローセルに添加される。フローセルに到達したところで流速は 0 になり、接触時間（Incubation time）分留まる。
Incubation time	回収溶液の接触時間（s）を入力する。
Deposition solution	回収溶液を中和する緩衝液を入力する。また、トリプシンやプロテアーゼなどをセット可能。アナライト添加前に、回収先となるバイアルに設定容量分を自動分注する。
Deposition solution volume	中和溶液の分注量（µl）を指定する。
Number of repetitions	1 サイクル中の添加・回収回数を入力する。最大 10 回。回収量を稼ぎたい場合に設定する。

↓

Conditioning をクリックする。



回収サイクル前のセンサーチップのコンディショニング条件の設定をおこなう。

Regeneration solution　　再生溶液を入力

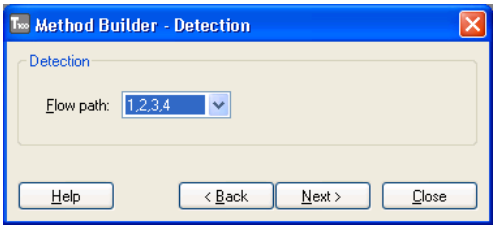
contact time　　添加時間（s）

Flow rate　　流速（µl/min）

Flow path　　1, 2, 3, 4 を選択

Setup Run をクリックする。

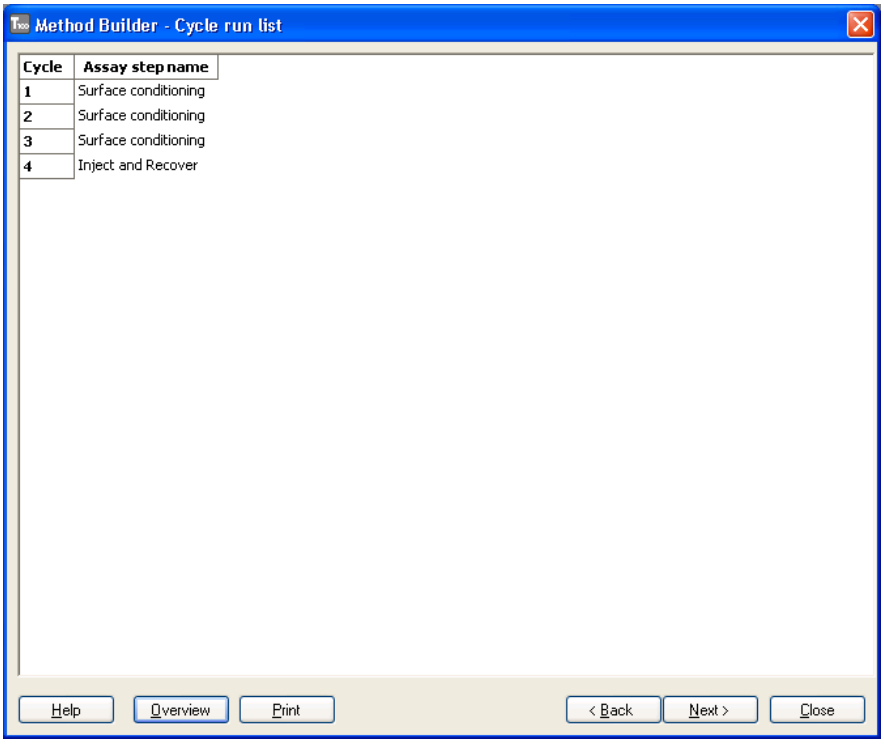
↓



Flow path:　　1, 2, 3, 4 を選択

Next >をクリックする。

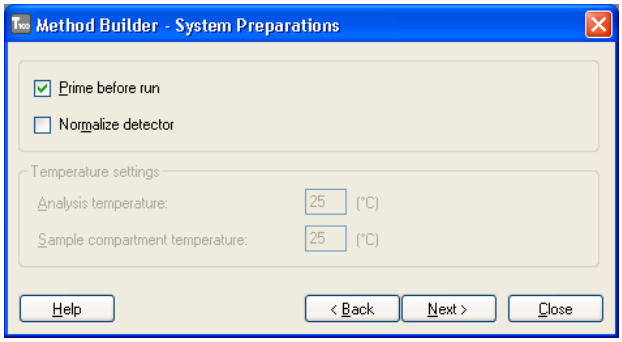
↓



測定サイクルリストが表示される。

Next >をクリックする。

↓



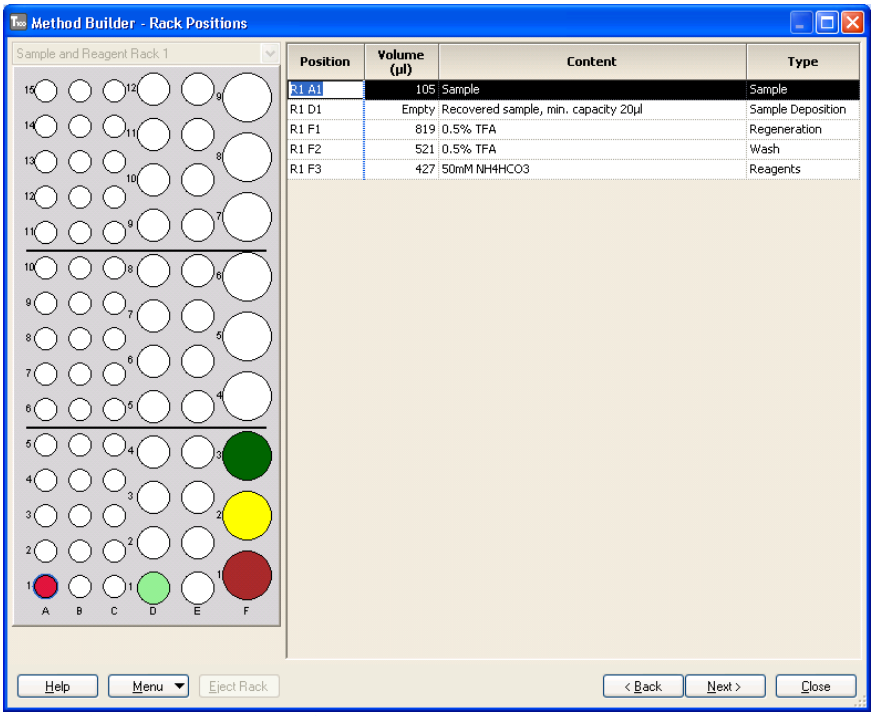
測定を始める前の **Prime** および **Normalize** の実施を選択する。

Temperature settings

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

Next >をクリックする。

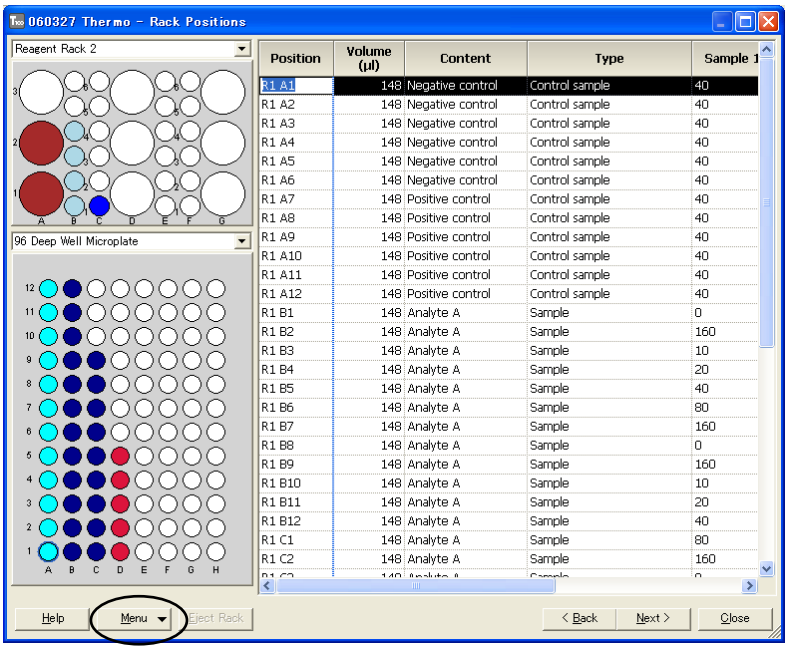
↓



右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

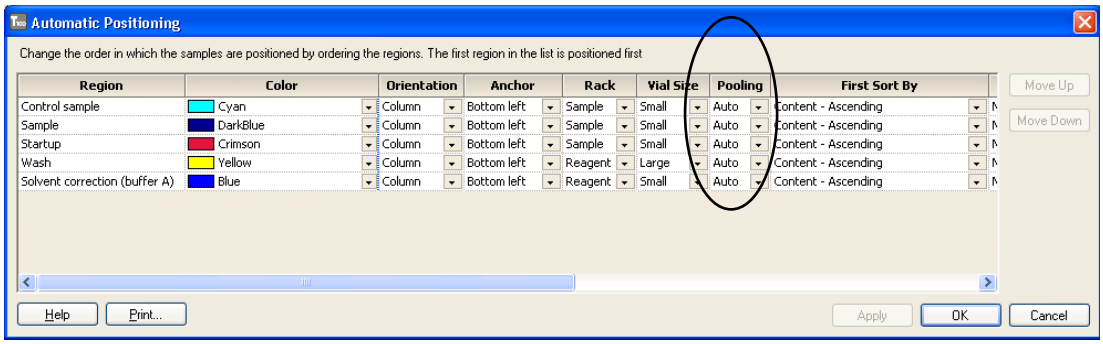
補足 5-83. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu から Automatic Positioning...を選ぶ。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定をおこなうことができる。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっている。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックする。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

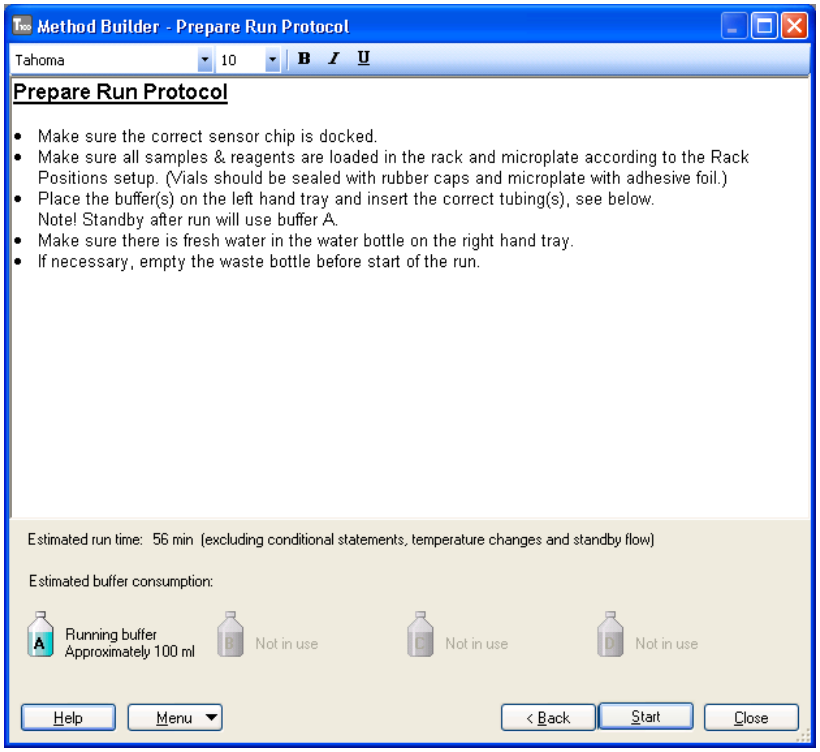
Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next >**をクリックする。

↓


Method Builder - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 56 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
Approximately 100 ml
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

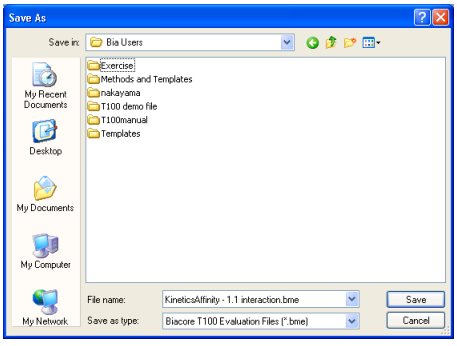
基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示される。

Start をクリックする。

↓

設定したメソッドをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

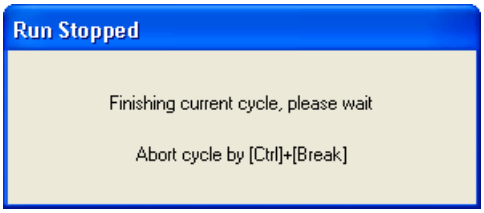
測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

補足 5-84. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。

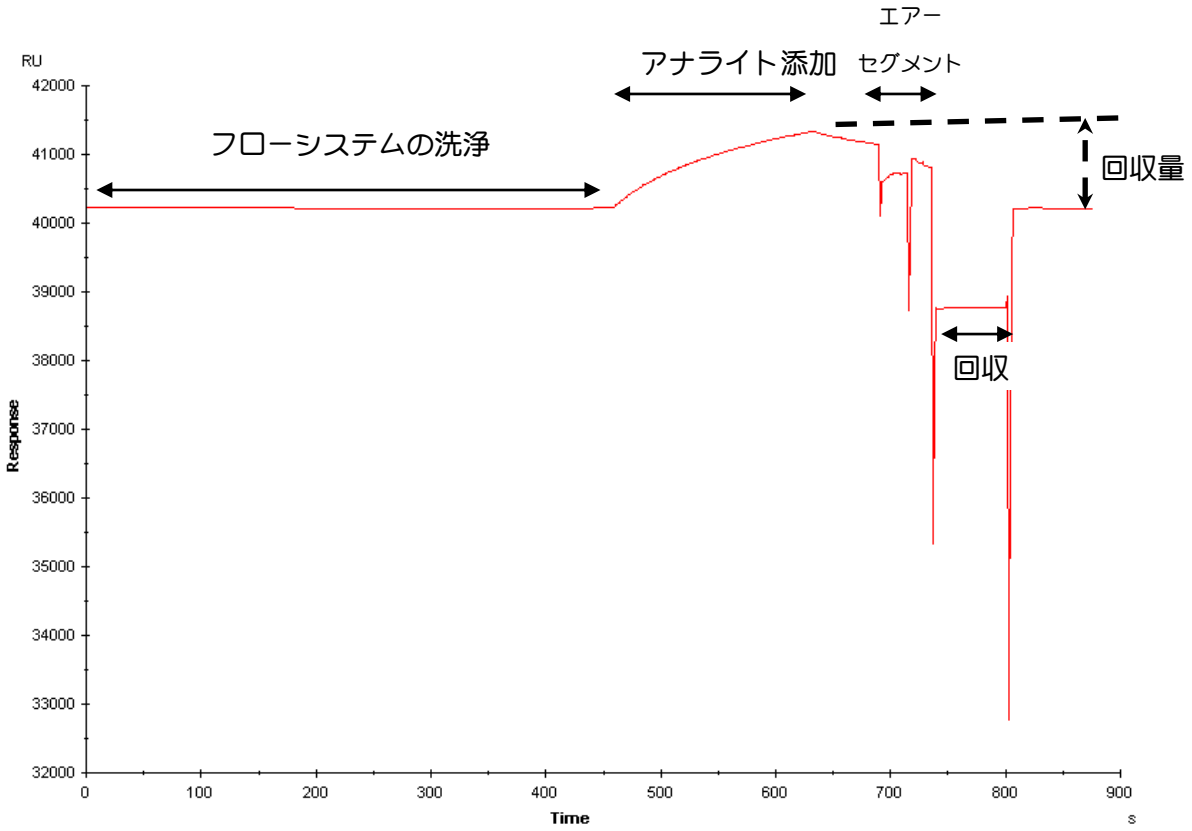
ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

回収のセンサーグラム



回収の評価

1000RU は約 1ng/mm^2 の質量変化に相当する。

回収操作終了後 60 秒後に、結合レスポンス（bound）を相対値 0 として計算した回収レスポンス（recovered）が得られる。4 つのフローセルの面積の合計は約 5.8 mm^2 なので、何 ng 回収できたかを推測することができる。回収レスポンスは、測定結果のレポートポイントテーブルを参照する。

Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
2	440.0	5	40218.2	0.53	0.60	0.00	0.0	Yes	baseline_1
2	680.0	5	41173.9	4.94	0.08	-2.64	955.7	Yes	bound_1
2	885.0	5	40108.7	238.03	199.27	84.33	-1065.2	No	recovered_1

6. メソッドによるプログラムの作成

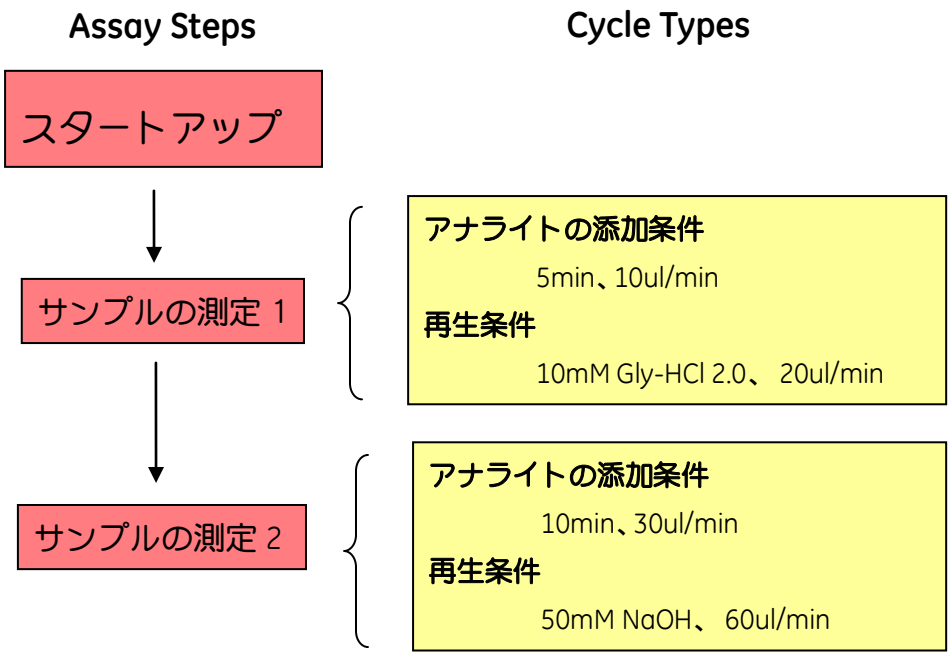
ウィザードで作成するプログラムには、リファレンスの選択や再生溶液の添加回数などに制約がある。そこで、ウィザードでは対応できない複雑なプログラムを使用したい場合は、メソッドビルダーで望みのメソッドを作成し実行する。作成時には、あらかじめ実験目的に応じたウィザードテンプレートから望みに近いプログラムを作成保存したファイルをメソッドビルダーで編集すると、効率が良く間違いも少なくなる。

メソッドの構成

メソッドビルダーの重要な設定項目は“**Assay Steps**”と“**Cycle types**”である。

始めに、**Assay Steps** で測定全体のアウトラインを設定する。一つもしくは複数の測定ステップを設定する。それぞれの測定ステップは Startup、Samples、Control Samples 等の測定目的別で設定する。

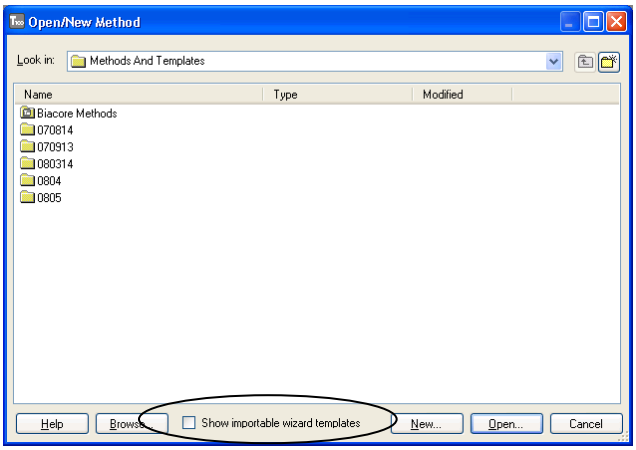
Cycle types は、測定ステップ別に詳細なプログラム（温度、流速、試料の添加順序等）を設定する。



6-1. ウィザードで作成保存したプログラムの呼び出し

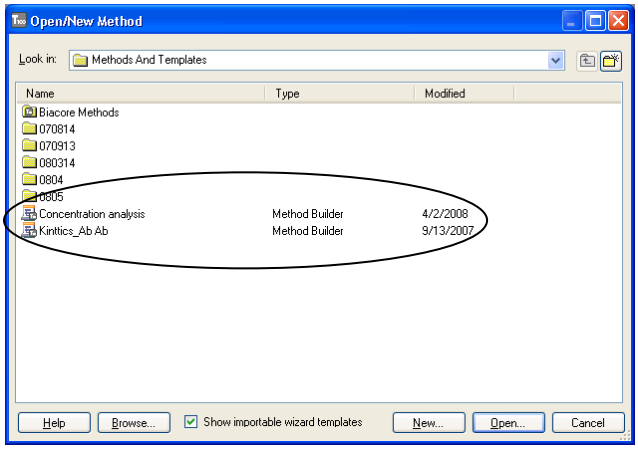
実験目的別に既存のテンプレートがある。既存のテンプレートがない場合には、実験目的に応じたウィザードで実験条件に近いプログラムを作成・保存し、以下の操作に入る。

Toolbar の **Run Method** アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Method...**をクリックする。



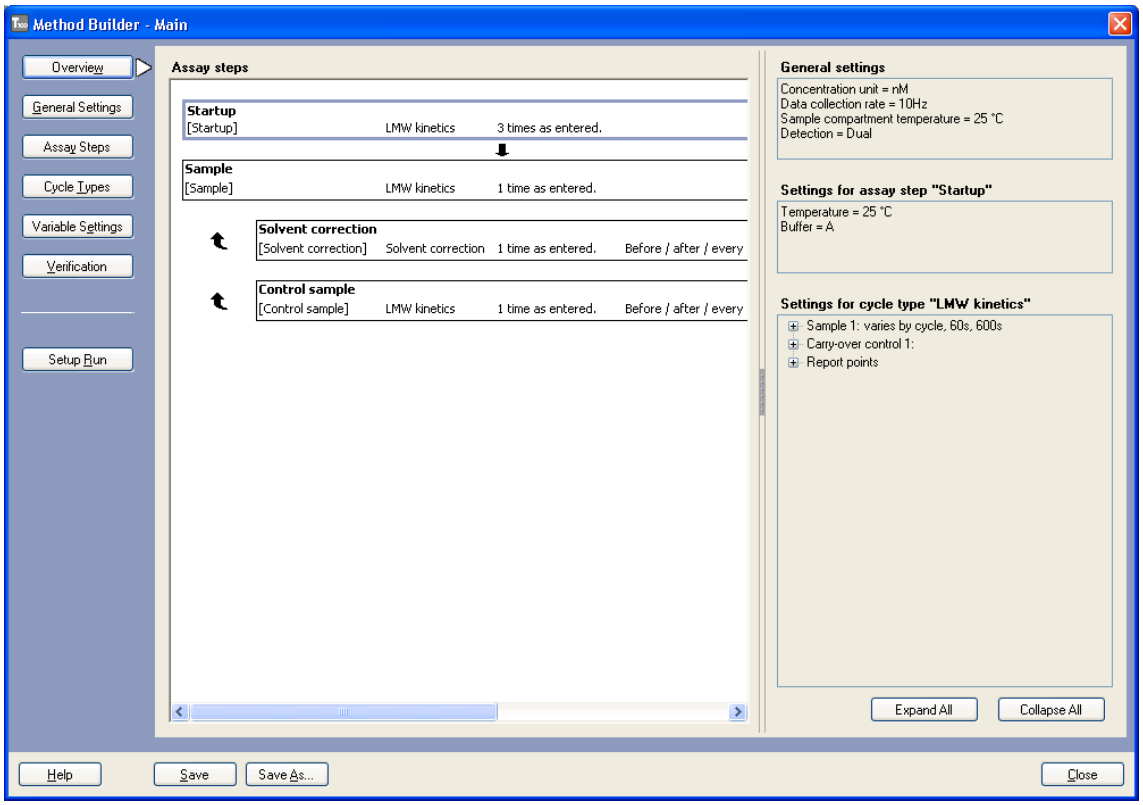
Show importable wizard templates にチェックを入れる。

↓



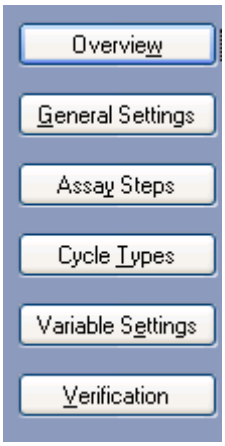
Methods and Templates フォルダ内に保存されているウィザードファイルが表示される。それ以外のフォルダに保存したファイルを呼び出す場合は、**Browse...**を利用する。目的のファイルを選択し、**Open...**をクリックする。

↓



ウィザードで作成したプログラムに入力されていた情報が自動的にメソッドの形式に変換される。ファイルを開いた直後は、メソッドビルダーの **Overview** 画面が表示されている。

6-2. メソッドの編集



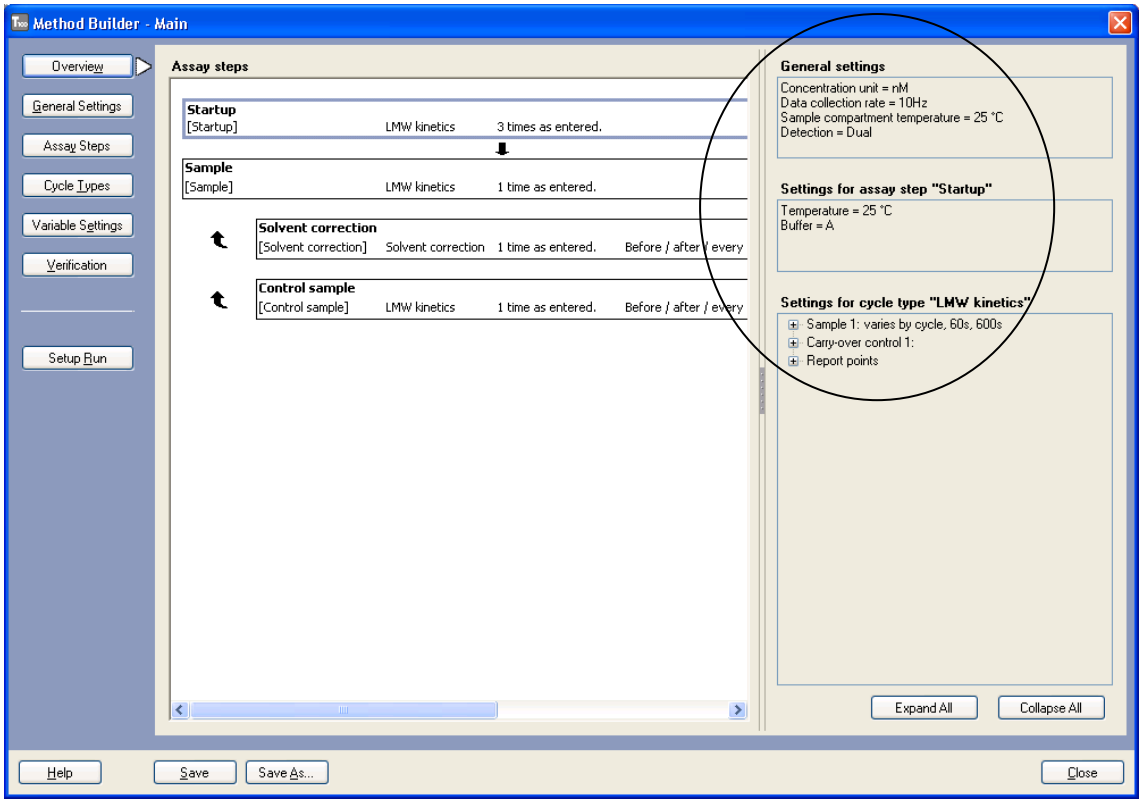
画面左列に設定ボタンが存在する。**General Settings** から **Verification** までの上から 5 つのボタンでメソッドを作成する。

Over view	測定内容の表示
General Settings	システム初期条件の設定

Assay Steps	測定全体のアウトラインの作成
Cycle Types	測定ステップごとの詳細なプログラムの設定
Variable Settings	変数入力方法の設定
Verifivcation	作成メソッドの確認

↓

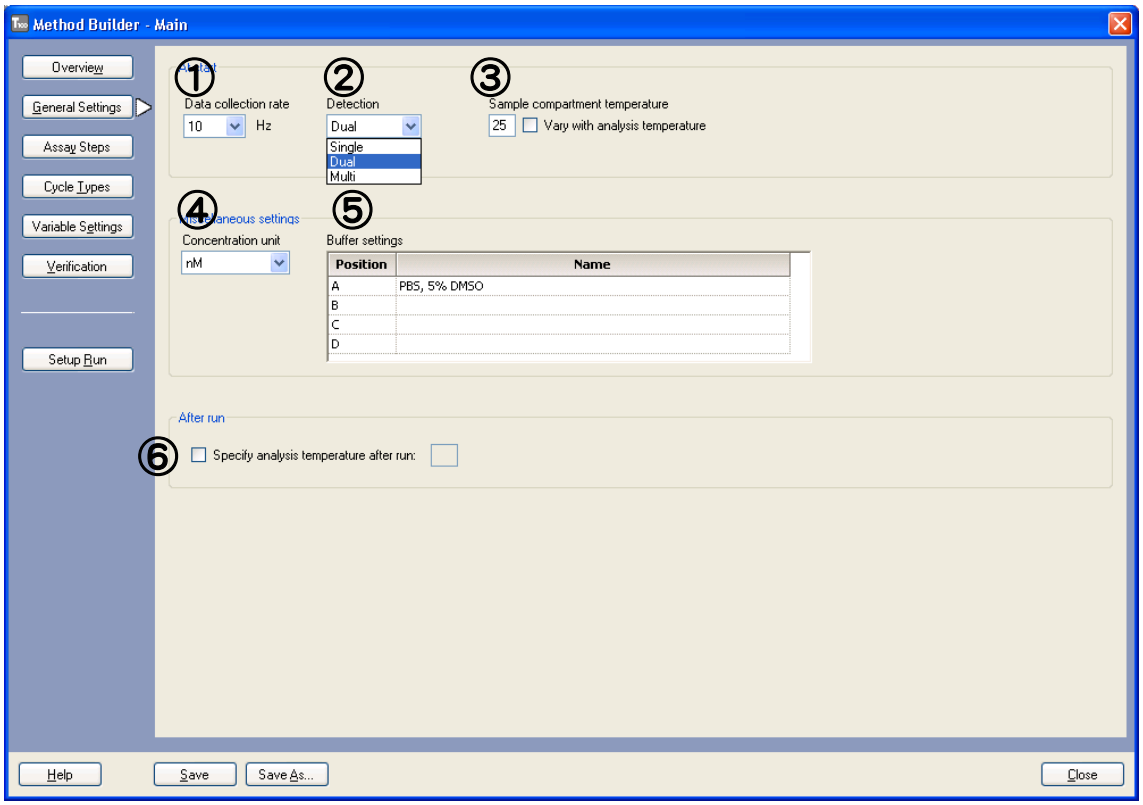
Over view をクリックする。



各項目をクリックすると、右側の画面で測定ステップの詳細を確認することができる。

↓

General settings をクリックする。



General settings では 6 項目の設定をおこなう。

① Data Collection rate

1Hz もしくは 10Hz を選択する。

反応速度定数、熱力学パラメータ算出の場合	10Hz
それ以外の実験目的の場合	1Hz

② Detection

流したいフローセルに対応した検出モードを以下の 3 つ（Single, Dual, Multi）から選択する。

Single	1、2、3、4
Dual	1,2、3,4、2-1、4-3
Multi	1,2,3,4、2-1,4-3、2-1,3-1,4-1

③ Sample compartment temperature

サンプルコンパートメントの温度（4～45℃）を設定する。室温より±15℃以内。サンプルコンパートメントの温度は、サンプルの安定性を考慮し、10℃程度に設定することもあるが、DMSO を含むサンプルの場合は、低温で析出することがあるので注意する。

Vary with analysis temperature

Analysis temperature と同じ温度に設定したい場合にチェックを入れる。

④ Concentration unit

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択する。

⑤ Buffer settings

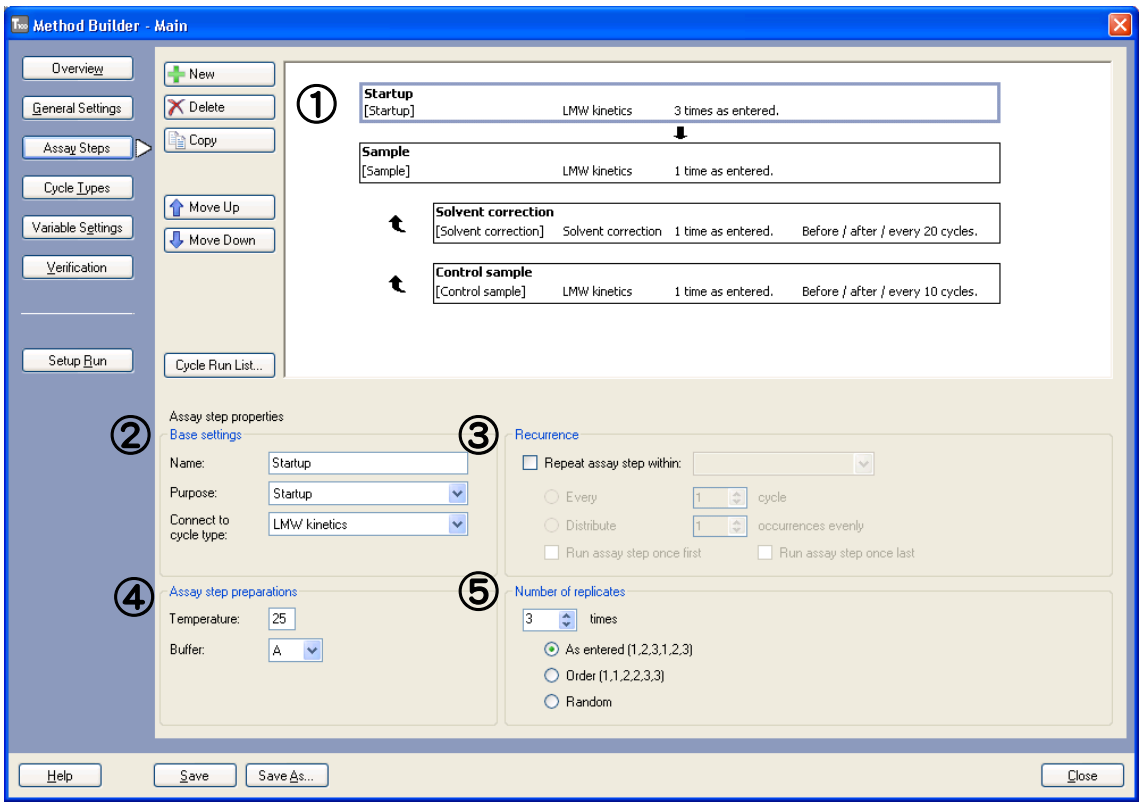
使用するランニング緩衝液名を入力しておくと、記録として残すことができる。

⑥ After run

この項目にチェックを入れておくと、全測定が終了した後に、センサー表面の温度が指定した温度に自動変更される。

↓

Assay steps をクリックする。

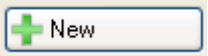


Assay steps では 5 つの設定項目がある。アッセイを正しく構築するためには、①、②および③の理解が必須である。

編集したい測定ステップをクリックし、各項目の設定をおこなう。

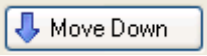
① Assay steps

測定ステップの作成と各測定ステップの配置をおこなう。

測定ステップを追加する場合は New （ 

） から作成できる。新規で作成する測定ステップは、後述する Purpose と Cycle type の関連づけが必要である。詳細は、補足 6-3. サイクルタイプおよびアッセイステップの追加を参照。

各測定ステップの配置は Move Up （

） および Move Down （ 

） にて調整する。測定ステップを削除したい場合には、該当の測定サイクルを選択後、Delete （

） をクリックする。

② Base settings

Name　　測定ステップの名称を入力する。名称は任意であるが、Purpose の名称と同一にするのが望ましい。

Purpose

各測定ステップを“何のために”実行するか設定する。Evaluationsoftware において各測定ステップを適切に認識するために必要かつ重要な項目である。以下の 7 種類がある。

Conditioning	**Startup**
Solvent correction	**Calibration**
Sample	**Control Sample**
Undefined	

Connect to cycle type

Cycle types 画面で定義したサイクルタイプとの関連づけをおこなう。サイクルタイプはプルダウンメニューに一覧で表示される。サイクルタイプに関しては、後述する該当項目を参照のこと。ウィザードで作成したプログラムを使用する場合は、自動的に適切な関連づけがされているので、新規のアッセイステップを追加しない限り、特に設定を変更する必要は無い。

③ Recurrence

Calibration、Control Sample、Solvent correction などをサンプル測定ステップ内で定期的に繰り返し実行するための設定項目である。通常、ウィザードで作成したプログラムを読み込んだ場合はすでに設定されている。必要があれば測定頻度の変更や、サンプル測定ステップの最初と最後に測定する項目を追加できる。詳細は、補足 6-1. 測定ステップの定期的な繰り返し実行の設定を参照のこと。

④ Assay step preparations

温度の入力とランニング緩衝液の選択をおこなう。ランニング緩衝液を 1 種類しか使用しない場合は設定する必要はない。（デフォルトでは、A が選択されている）

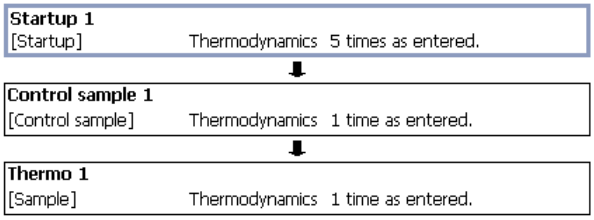
⑤ Number of replicates

同一サンプル（コントロールサンプルや検量線用試薬も同じ）について繰り返し測定回数を入力する。あわせて、測定順序を **As Entered**、**Order** および **Random** の中から選択する。

↓

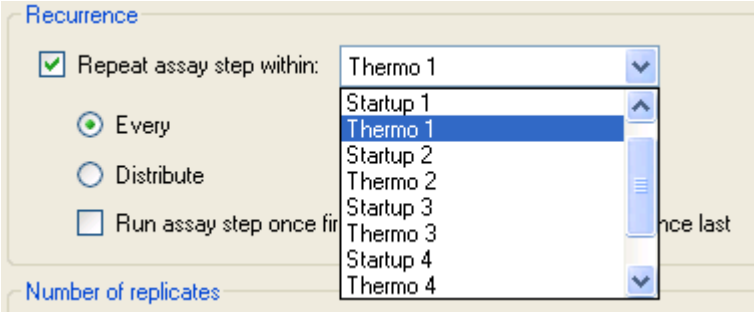
補足 6-1. 測定ステップの定期的繰り返しの実行設定

各ステップは（⇩）の入力順に実行される。

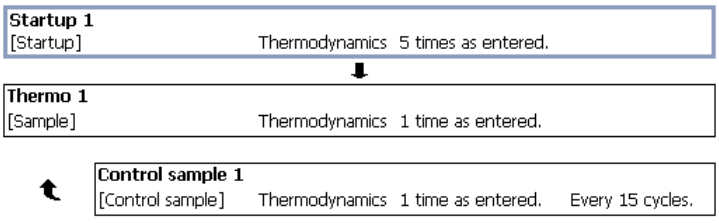


スタートアップ（Startup 1）が実行された後、コントロールサンプル（Control Sample 1）の測定ステップを実施。終了後、解析に必要なサンプルの測定ステップ（Thermo 1）が実行される。ここで、コントロールサンプルの測定をサンプル測定中に定期的に繰り返し実行したい場合には、**Recurrence** の設定をおこなう。

Control Sample に該当するステップ（Control Sample 1）を選択する。



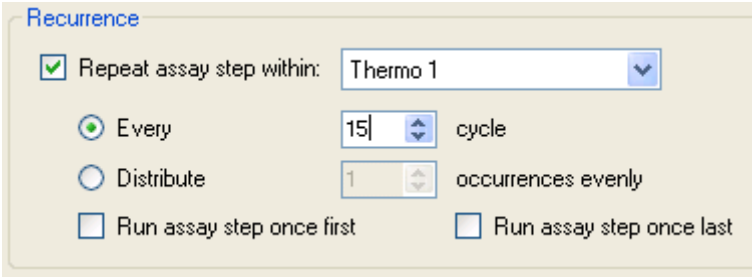
Repeat assay step within にチェックを入れ、どの測定ステップの中で定期的に測定を実行するかを右側のプルダウンメニューから選択する（アッセイステップ内のすべての測定ステップが表示される）。通常、コントロールサンプルの測定や溶媒補正用曲線の測定はサンプル測定ステップ内（ここでは Thermo 1）である。



矢印（ は差し込み測定を表しており、矢印が向かっているステップ（ここでは Thermo 1）の中で実行される。

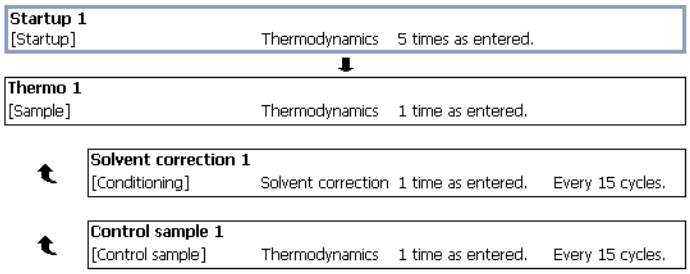
測定頻度に関しては、**Every** もしくは **Distribute** にチェックを入れて適切な数値を入力する。必要に応じて、**Run assay step once first**（矢印が向かっている先のステップが開始される

直前に実施）および **Run assay step once first**（矢印が向かっている先のステップが終了した後に実施）にチェックを入れる。



間隔の確認に関しては、**Cycle Run List** 機能を使うと便利である。使用方法は、補足 6-2. サイクルの測定順序の確認と変更を参照のこと。

なお、測定ステップが複数存在する場合は、上から並んだ順に実行される。必要に応じて、**Move Up** および **Move Down** を用いて並び替える。

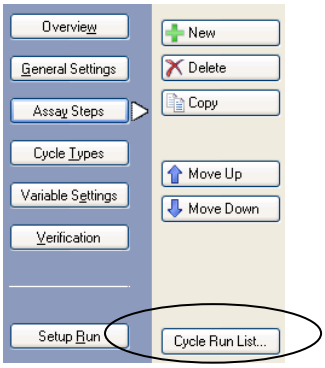


上に示した例ではアナライトが 30 サンプルの場合は以下のように測定が実行される。

↓ **Startup 1**
↓ **Solvent correction 1**
↓ **Control Sample 1**
↓ **Thermo 1**　　1 から 15 番目までのアナライト
↓ **Solvent correction 1**
↓ **Control Sample 1**
↓ **Thermo 1**　　16 から 30 番目のアナライト

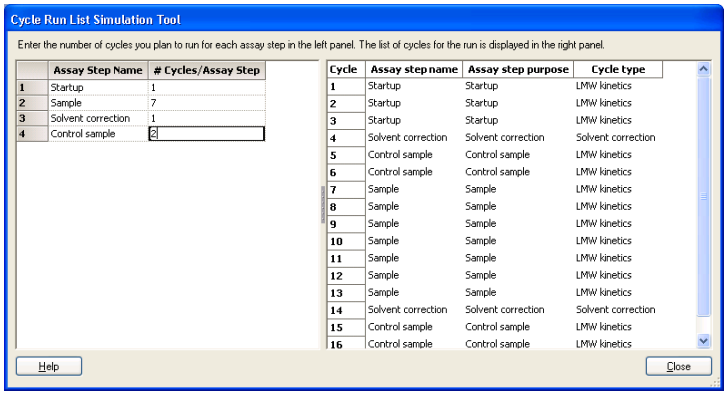
補足 6-2. サイクルの測定順序の確認と変更

サンプル測定ステップ内において、溶媒補正用曲線、コントロールサンプル等はサンプル数に応じて複数回繰り返し実行する。繰り返し回数の設定は **Recurrence** および **Number of replicates** で設定する。実際にどういう順序で溶媒補正用曲線、コントロールサンプル等が実行されるか、アッセイステップを作成している際に **Cycle Run List...**で確認ができる。

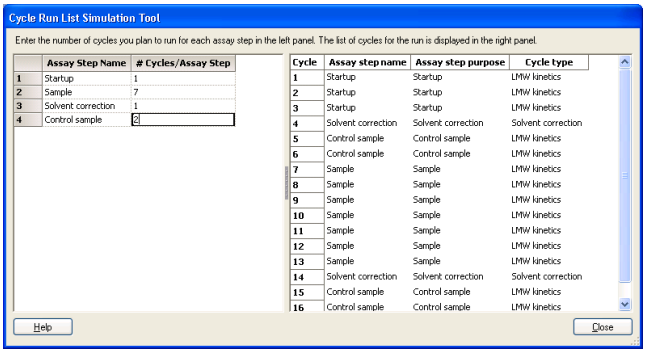


溶媒補正用曲線、コントロールサンプル等のステップに関して **Recurrence** および **Number of replicates** を望みの間隔になるように数値等を入力し、**Cycle Run List...**をクリックする。

↓

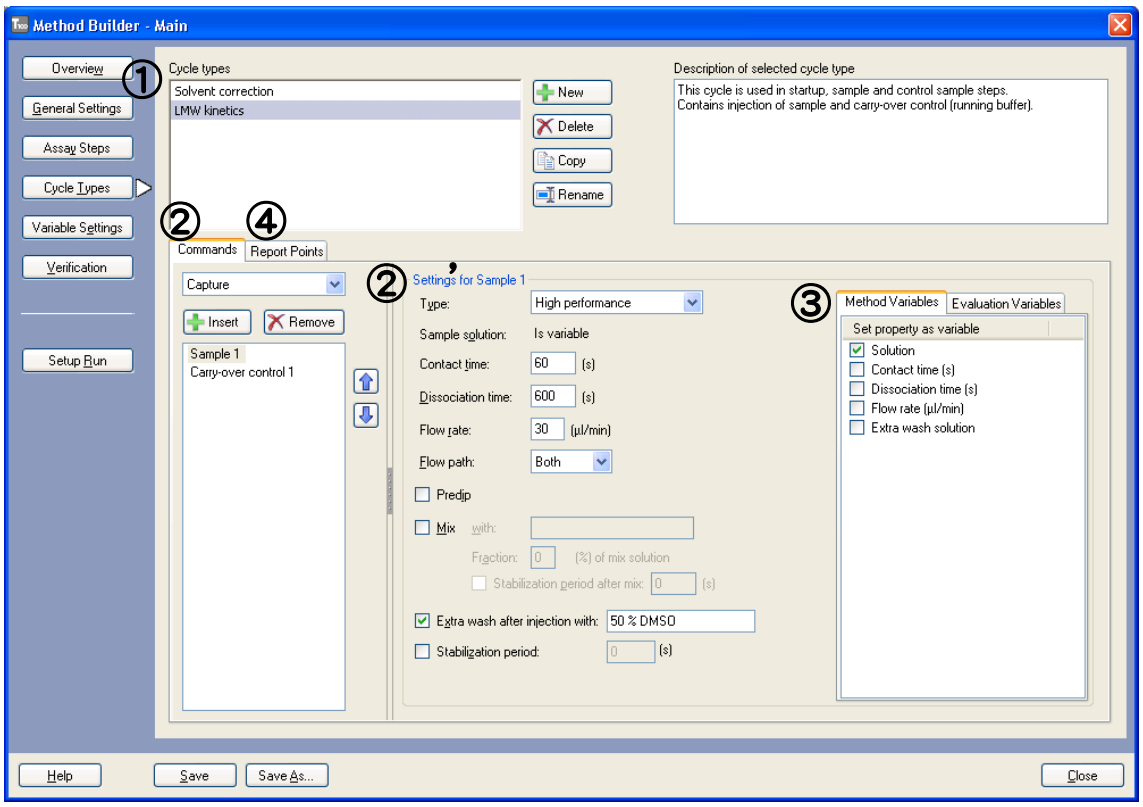

Cycle Run List Simulation Tool
Enter the number of cycles you plan to run for each assay step in the left panel. The list of cycles for the run is displayed in the right panel.
Assay Step Name
Cycles/Assay Step
Startup 1
Sample 7
Solvent correction 1
Control sample 2
Cycle
Assay step name
Assay step purpose
Cycle type
Help
Close

各ステップ名が表示される。**# Cycles/Assay step** に、各ステップ内における測定サンプル数を入力する。例）**Startup** : 1、**Sample** : 7、**Solvent correction** : 1、**Control Sample** : 2


Cycle Run List Simulation Tool
Enter the number of cycles you plan to run for each assay step in the left panel. The list of cycles for the run is displayed in the right panel.
Assay Step Name
Cycles/Assay Step
Startup 1
Sample 7
Solvent correction 1
Control sample 2
Cycle
Assay step name
Assay step purpose
Cycle type
Help
Close

ウィンドウ内の右側に測定サイクルの順番がリスト表示される。望みの順序になるように、必要に応じて **Recurrence** および **Number of replicates** の設定を変更する。

Cycle types をクリックする。

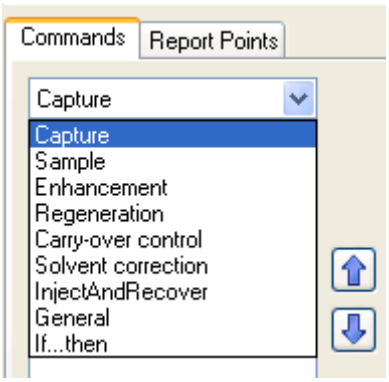


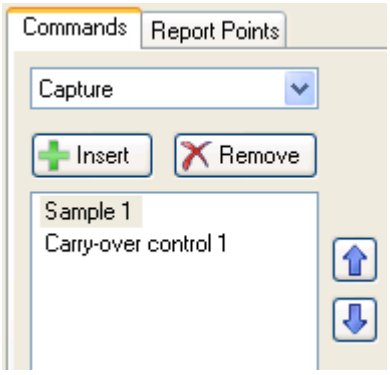
Cycle types では大きく分けて 4 つの設定項目がある。

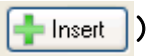
① サイクルタイプの作成、削除、名前の変更

ウィザードで作成したプログラムを読み込んでいる場合は、通常はここで新たなサイクルタイプを追加する必要は無い。作成法の詳細は、補足 6-3. サイクルタイプおよびアッセイステップの追加を参照。

② 各サイクルのコマンドの設定およびパラメータの入力





各コマンドをプルダウンメニューから選択し、**Insert** （  ）をクリック

して追加する。各コマンドの順序は および にて調整する。各コマンドのパラメータの入力は、右隣の画面②'でおこなう。以下の 9 種類ある。
使用頻度が高いのは **Capture**、**Sample**、**Regeneration** などである。中でも Sample は、Evaluation software で、反応速度定数や親和定数の算出および濃度測定などの解析を実行する際に必須コマンドである。

Sample

測定サンプル（アナライト）の添加コマンド。

Types:　添加モード。

Low Sample consumption
サンプルの消費量が少ない。サンプル消費量は、7mm プラスチックバイアル使用時、添加容量 + 25 µl。

High performance
サンプル添加時の希釈が少ない。サンプル消費量は、7mm プラスチックバイアル使用時、添加容量 + 58 µl。主に、反応速度定数や解離定数の算出時に用いる。

Single cycle kinetics
シングルサイクル法による反応速度定数や解離定数算出時に用いる。最大 5 濃度までアナライトの連続添加が可能。サンプル消費量は、7mm プラスチックバイアル使用時、添加容量 + 58 µl。

Sample solution:　複数サンプル測定する場合、Is variable と設定される。

contact time:　サンプル添加時間（s）

Dissociation time:　解離時間（s）。シングルサイクルカイネティクス測定では、最後に添加するサンプルの解離時間の設定となる。

Flow rate:　流速（µl/min）

Flow path:　サンプル添加流路。
Detection を **Dual** に設定している場合、以下のフローセルにサンプルが流れる。必要に応じて選択する。

First	2-1 の場合は 1、4-3 の場合は 3
Second	2-1 の場合は 2、4-3 の場合は 4

Both　2-1 の場合は 1 および 2
4-3 の場合は 3 および 4
Detection を **Multi** に設定している場合は、該当するフローセル番号をプルダウンメニューから選択する。

Predip　サンプルを分取する前のニードル洗浄をおこなう場合にチェックを入れる。

Mix with:　サンプルの混合。
各サンプルは指定された溶液と混合後に添加される。
混合したい溶液の名称を入力する。**Fraction:**にサンプルおよび混合用溶液の“混合比”を入力する。
例えば 20（%）と入力すると、混合用溶液 20%とサンプル 80%が混合される。混合後は、**Stabilization period after mix** に入力された時間が経過した後に添加される。
阻害法を用いた濃度測定実験で使用することが多い。
なお、**Mix** 機能を使用する場合には必ず混合用のバイアルが必要になる。

Extra wash after injection with:
サンプル添加後のフローセル以外の流路の洗浄をおこなう場合にチェックを入れる。洗浄溶液名を入力する。
センサーチップ表面には流れない。

Stabilization period:　次のコマンド実行までの待機時間を設定したい場合にチェックを入れる。待機時間（s）を入力する。

Capture
リガンドのキャプチャー用添加コマンド。

Enhancement
アナライトの結合確認、またはシグナル増幅として 2 次抗体などの添加コマンド。

Regeneration
再生溶液の添加コマンド。粘性が高い溶液（40% グリセロール以上）を使用する場合は、**High viscosity solution** にチェックを入れる。

Carry-over control

キャリーオーバーチェックの添加コマンド。

40 µl/min で 30 秒ランニング緩衝液を添加する。Evaluation Software で結合レスポンスからキャリーオーバーを評価する。低分子化合物をアナライトとして添加する場合は、測定サイクルの最後に実施することを推奨する。

Solvent correction

溶媒補正溶液の添加コマンド。

30 µl/min で 30 秒溶媒補正溶液を添加する。溶媒補正溶液を添加する数だけ、コマンドを挿入する。詳細は、5-7. 低分子化合物アナライトの相互作用測定を参照。

InjectAndRecover

結合したアナライトの回収コマンド。5-8. 結合アナライトの回収を参照。

General

Sample コマンドと同等の機能をもつが、添加モードに **Dual Inject** の機能が追加されている。**Dual Inject** は、1 つ目のサンプル添加終了後、ランニング緩衝液での自動洗浄をはさむことなく、引き続き 2 つ目のサンプルを添加することができる。ただし、General コマンドで実行したデータは解析に持ち込まない。

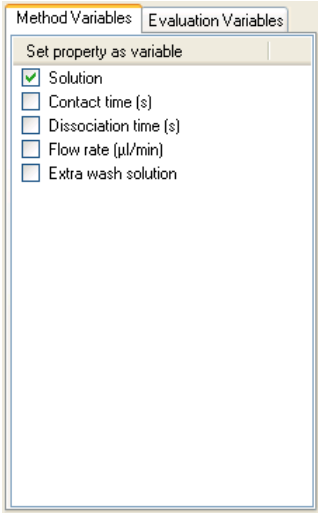
If...Then

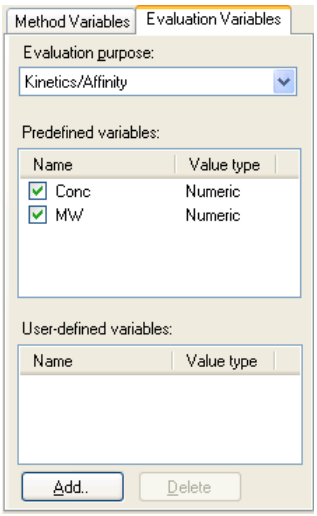
自動判断機能コマンド。

取得したレポートポイントから、その次の操作コマンドの追加、省略、プログラム全体を終了させる設定が可能。

③ 各測定サイクルの変数の設定

変数設定には、**Method Variables** と **Evaluation Variables** の 2 つがある。





Method Variables

各測定サイクルのコマンドおよびパラメータの変数の設定。通常、サンプルコマンドの変数の設定は、Solution にチェックが入っている。測定サイクルごとに添加時間などを変数として設定したい場合は、各項目にチェックを入れる。

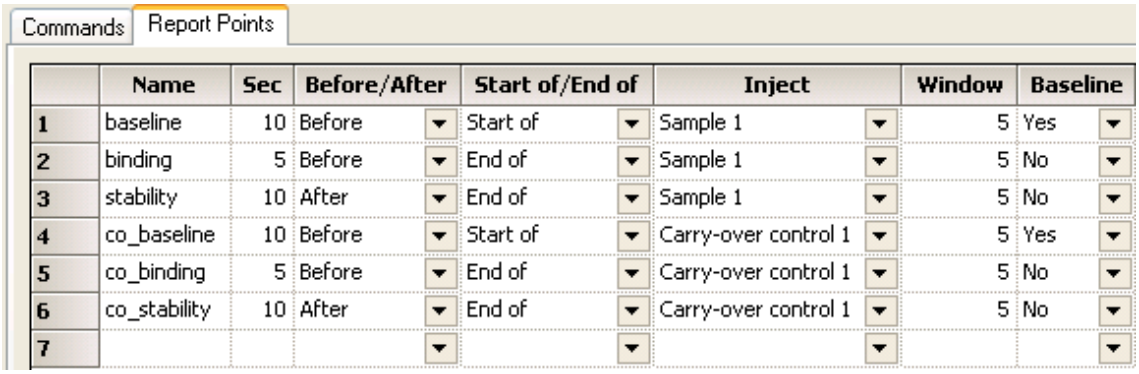
Evaluation Variables

解析ソフトウェアに反映される変数の設定および解析目的の設定。
テンプレートのメソッドやウィザードで作成したプログラムを開いている場合、Evaluation purpose に応じて解析に必要な変数はあらかじめ設定されている。それらのチェックははずさないように注意する。チェックが入っていなくても測定自体は実行されるが、Evaluation software による解析は実行できない。
プログラムに定義されていないパラメータを作成する場合は、User defined variables 下の **Add...**をクリックし作成する。**Evaluation purpose** は、**Sample** コマンドの設定時のみ表示される。**Evaluation purpose** には以下の 7 種類がある。

Kinetics/Affinity　　**Thermodynamics**
Concentration　　**Affinity in solution**
Kinetics – Heterogeneous analyte　　**Calibration – free conc**
General

④ レポートポイントの編集

Report Points タブをクリックすると、各コマンドのレポートポイントの一覧を見ることができる。レポートポイントの追加方法は以下の通りである。


Commands | Report Points

	Name	Sec	Before/After	Start of/End of	Inject	Window	Baseline
1	baseline	10	Before	Start of	Sample 1	5	Yes
2	binding	5	Before	End of	Sample 1	5	No
3	stability	10	After	End of	Sample 1	5	No
4	co_baseline	10	Before	Start of	Carry-over control 1	5	Yes
5	co_binding	5	Before	End of	Carry-over control 1	5	No
6	co_stability	10	After	End of	Carry-over control 1	5	No
7							

Name　　レポートポイントの名称を入力。

Sec　　Start of / End of および Inject で定義されるイベントから何秒離れた時刻にレポートポイントを取るかを設定。

Before / After　　Start of / End of および Inject で定義されるイベントの前

後どちら側にレポートポイントを取るかを設定。

Start of / End of　Inject で定義されるイベントの開始時刻および終了時刻のどちらを基準点にするかを設定。

Inject　取得したいレポートポイントと関連づけるイベントをプルダウンメニューから選択。

Window　レポートポイントの値（RU）を算出するための時間幅を設定。通常 5 秒。指定した時間の平均値をレポートポイントとする。

Baseline　該当するレポートポイントをベースライン（相対値 0）にするか設定。

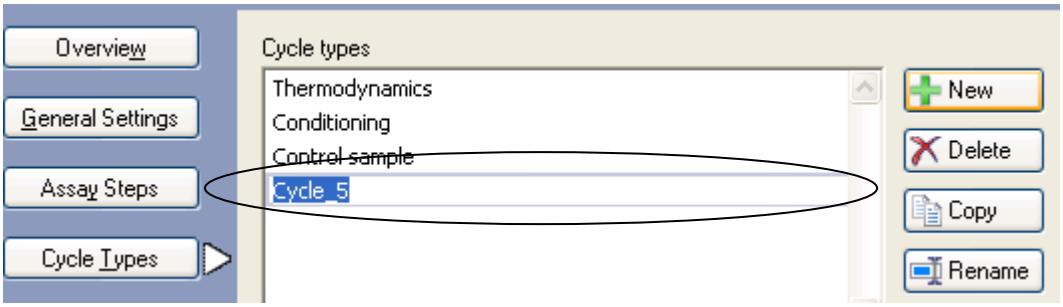
↓

補足 6-3. サイクルタイプおよびアッセイステップの追加

アッセイステップはそのメソッドに存在するいずれかのサイクルタイプと必ず関連づける必要がある。新規サイクルタイプの追加と、関連づける新規アッセイステップの追加の流れを示す。ここでは、低分子アナライト測定時に必要な溶媒補正用曲線の作成ステップ（Solvent correction）の追加を例として説明する。

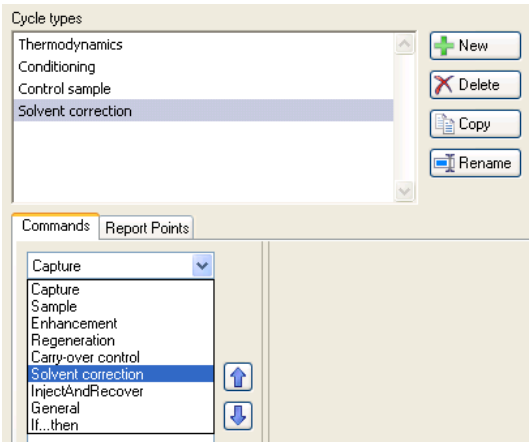
Cycle types 画面にて **New** （

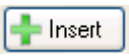
）をクリックする。



Rename で新規サイクルタイプの名称を入力する（ここでは **Solvent correction**）。

↓



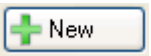
Commands タブのプルダウンメニューから **Solvent correction** を選択して、**Insert** （ 

） をクリックする。

↓

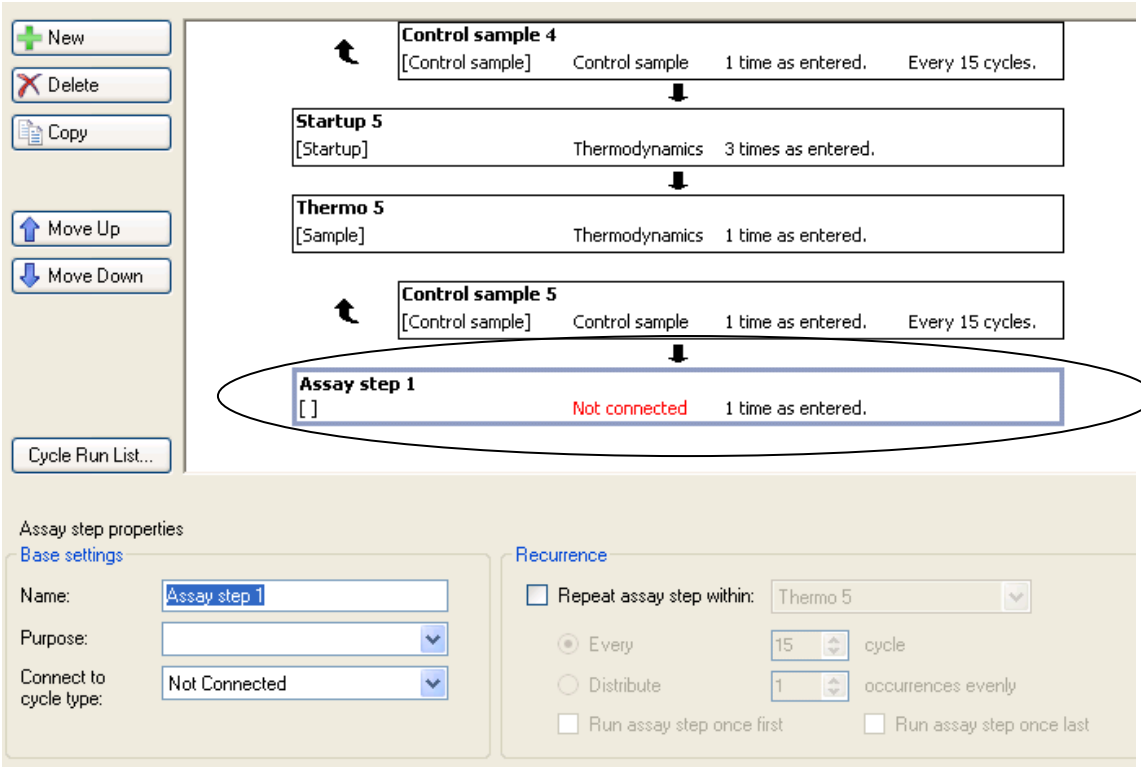
溶媒補正溶液を添加する数だけコマンドを追加したら、新規のサイクルタイプの作成は完了である。

続いて、**Solvent correction** のステップをアッセイステップに追加する。

Assay steps ダイアログにて **New** （ 

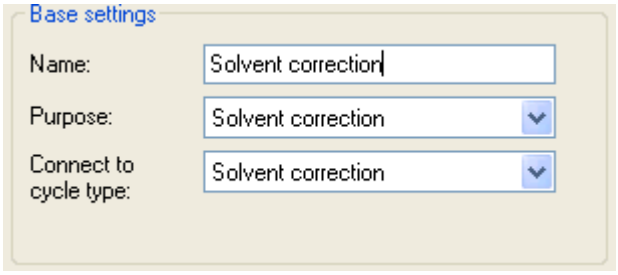
）をクリックする。

↓



アッセイステップの最後尾に新規のステップ（ここでは **Assay step 1**）が挿入される。Assay step 1 をクリックして選択し、**Base settings** の設定に移る。

↓



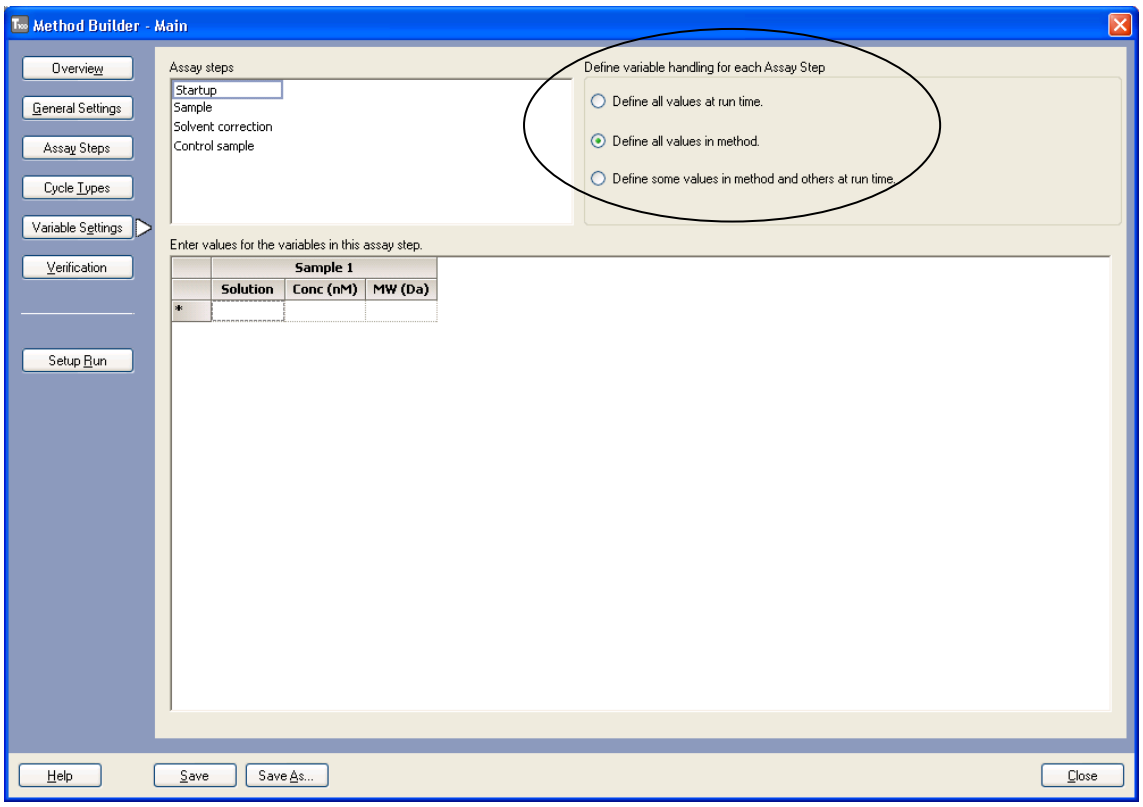
Name	Solvent correction
Purpose	Solvent correction
Connect to cycle type	Solvent correction

以上でステップの追加は完了する。

↓

追加したステップは必要に応じて **Recurrence**、**Number of replicates**、**Assay step preparations** を適切に設定する。

Variable Settings をクリックする。



各ステップの変数の入力をどの時点でおこなうか、画面右上の 3 項目から選択する。

Define all values at run time

測定開始直前に入力する。

Define all values in method

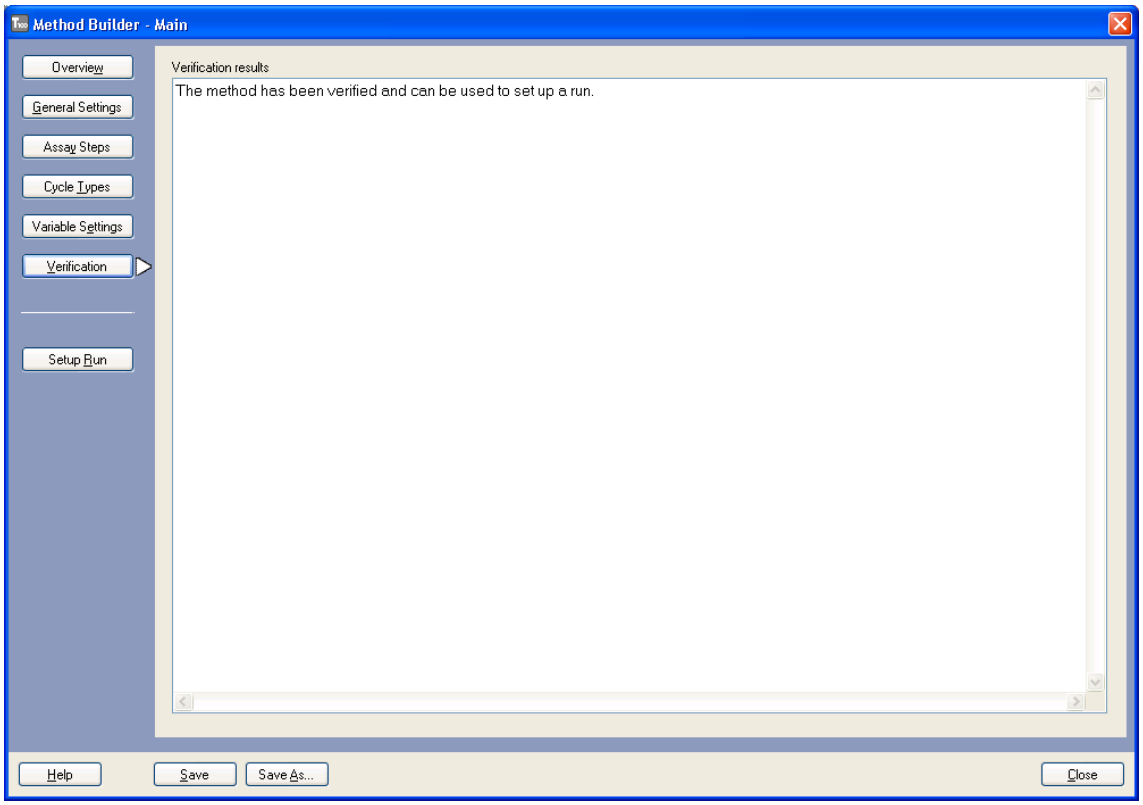
現画面上で入力する。作成したメソッドを頻繁にテンプレートとして使用し、毎回変更がない場合は、ここで入力しておくと、測定直前での情報入力が不要になるので便利である。

Define some values in method and others at run time

幾つかの情報を現画面上で入力し、その他の情報は測定開始直前に入力する。

↓

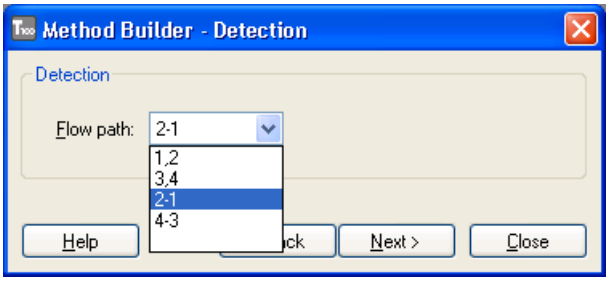
Verification をクリックする。



メソッドの設定に不備が無ければ“The method has been verified and can be used to set up a run.”と表示される。問題がある場合は該当部分が表示されるので、指示に従って修正する。

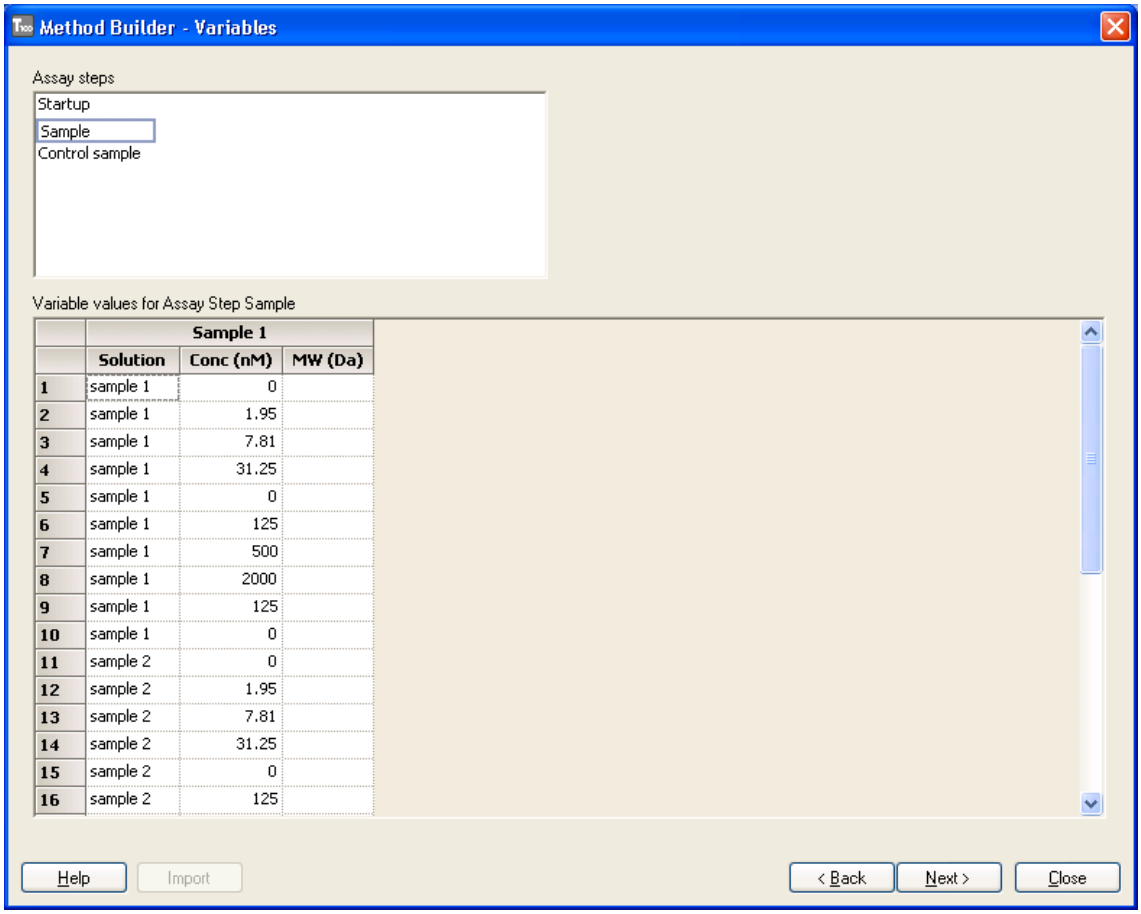
確認後、**Setup Run** をクリックする。

↓



適切な **Flow path** を選択し、次へ進む。

↓



Sample & Assay Setup のすべてのステップについて必要事項を入力する。

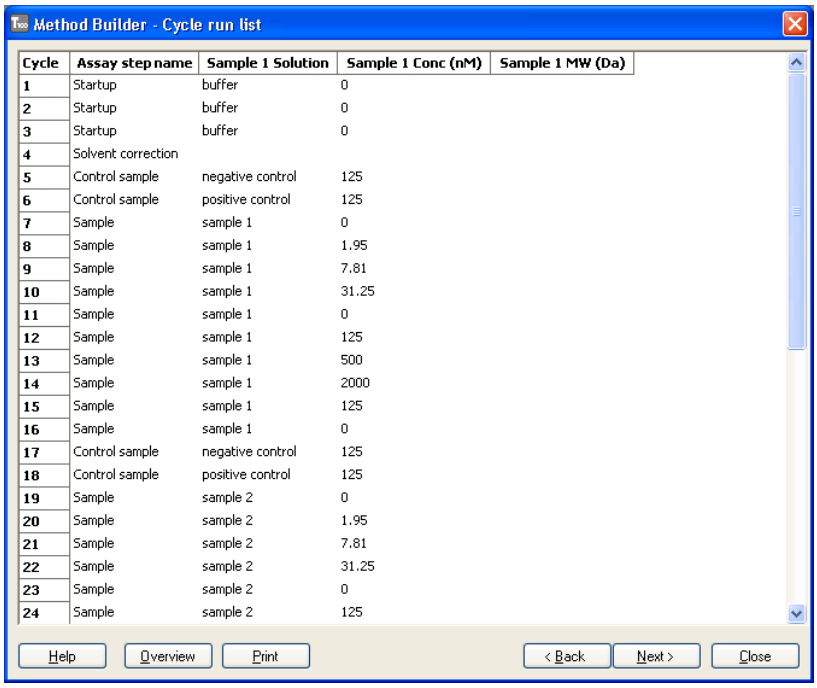
“**Define all values at run time**”を選択したステップは、この時点でサンプル情報の入力が必要となる。各ステップをクリックすると、画面下にサンプル情報を入力できるようになる。入力する必要のないカラムが出てきた場合は、空欄のまま次に進む。

補足 6-4. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択する。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力する。

すべての項目を入力後、**Next >**をクリックする。

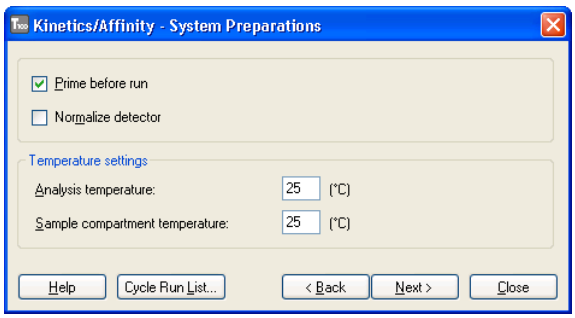
↓



Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 Conc (nM)	Sample 1 MW (Da)
1	Startup	buffer	0	
2	Startup	buffer	0	
3	Startup	buffer	0	
4	Solvent correction			
5	Control sample	negative control	125	
6	Control sample	positive control	125	
7	Sample	sample 1	0	
8	Sample	sample 1	1.95	
9	Sample	sample 1	7.81	
10	Sample	sample 1	31.25	
11	Sample	sample 1	0	
12	Sample	sample 1	125	
13	Sample	sample 1	500	
14	Sample	sample 1	2000	
15	Sample	sample 1	125	
16	Sample	sample 1	0	
17	Control sample	negative control	125	
18	Control sample	positive control	125	
19	Sample	sample 2	0	
20	Sample	sample 2	1.95	
21	Sample	sample 2	7.81	
22	Sample	sample 2	31.25	
23	Sample	sample 2	0	
24	Sample	sample 2	125	

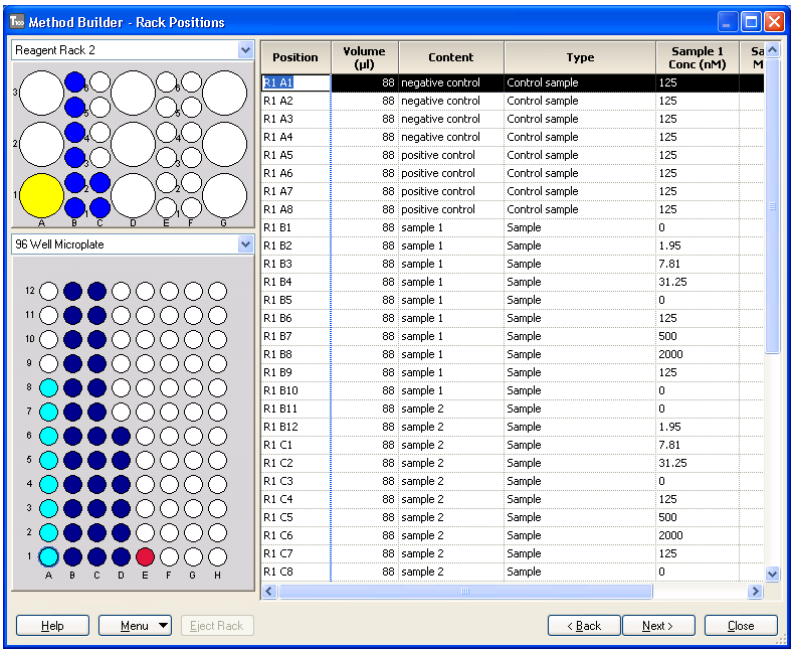
サイクルリストが表示される。上から順番に測定が実行される。
問題が無ければ、**Next >**をクリックする。

6-3. メソッドの実行



測定を始める前に、**Prime** および **Normalize** をおこなう設定ができる。
設定後、**Next >**をクリックする。

↓



右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認する。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示される。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットする。

補足 6-5. サンプル位置の変更

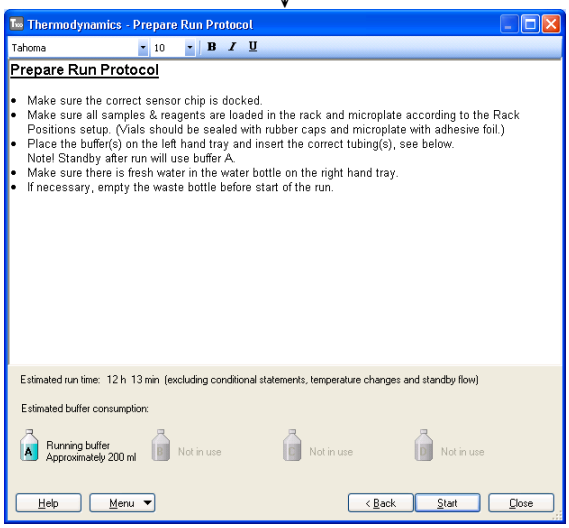
サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定される。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu → Export Positions...** を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存する。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu → Simple Position Import...**でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更される。

Eject Rack をクリックして、**Rack tray port** を開く。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックする。**Eject Rack Tray** ダイアログが閉じた後、**Rack Positions** ダイアログ右下の **Next** をクリックする。

↓


Thermodynamics - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 12 h 13 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
Approximately 200 ml
Not in use
Not in use
Not in use
Help
Menu
< Back
Start
Close

測定時の基本的な共通注意事項と測定時間、必要なランニング緩衝液容量が表示される。**Start** をクリックする。

↓

設定したメソッドをテンプレートとして保存するかメッセージが表示される。保存の場合は、**Save as** で **Methods and Templates** フォルダまたは **Bia Users** の各自のフォルダに保存する。保存しない場合は、**Don't Save** を選択する。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、**File name** にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートする。

↓

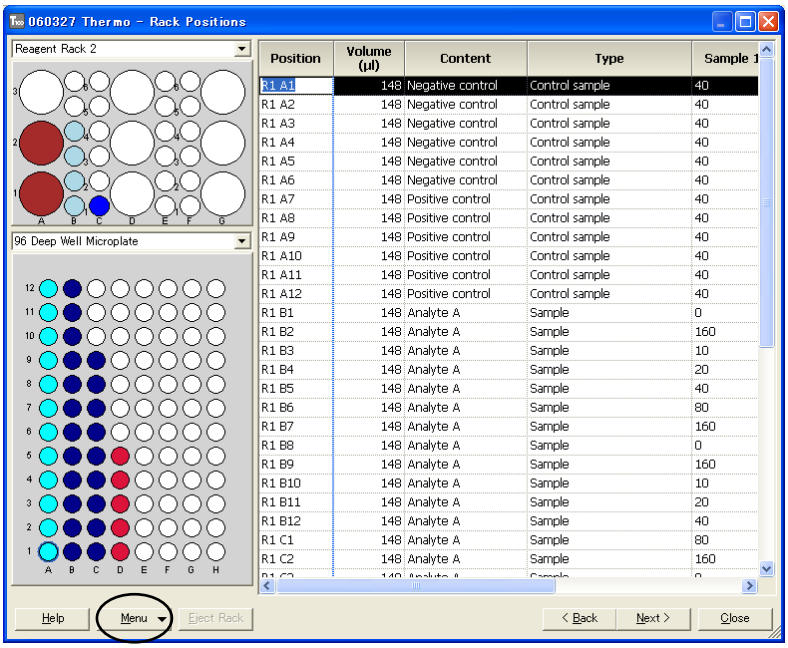
終了後、装置は **Standby flow** 状態になる。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T100 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示される。
解析およびデータの評価は各章を参照。

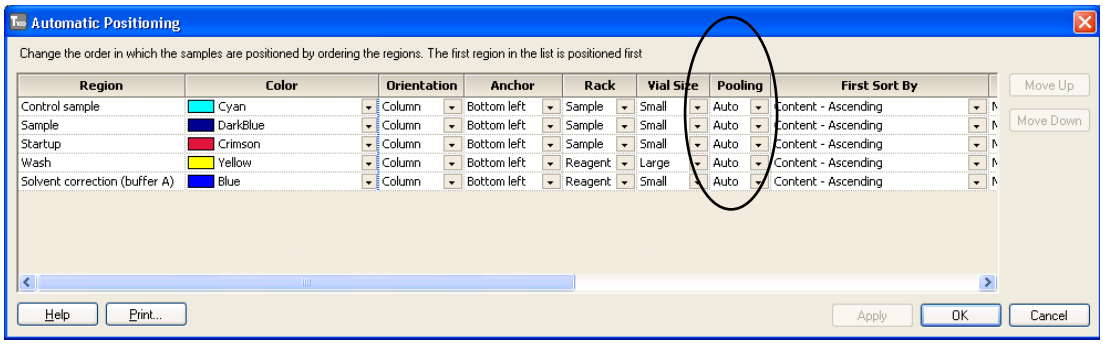
補足 6-6. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示される）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用する。



Menu から Automatic Positioning...を選ぶ。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定をおこなうことができる。

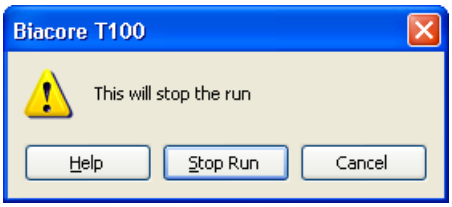
“Pooling”の項目は、通常、Auto になっている。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックする。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更する。

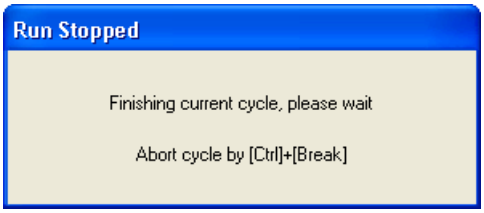
補足 6-7. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run...**をクリックする。



ボックス中の **Stop Run** をクリックする。

↓



実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了する。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの**[Ctrl]**キーと**[Break]**キーを同時に押す。
終了した時点までのデータが Biacore T100 Evaluation Software に移行される。

7. メンテナンス

システム内部に設置されているマイクロ流路系は、消耗品であり、使用するサンプルの性状や使用頻度に応じて、耐久月数が異なる。**より長くマイクロ流路系を使用するために、システム使用毎のメンテナンスの実施を推奨する。**

システムのメンテナンスは既定のメンテナンスプログラム（Menu bar の **Tools** → **More Tools...** → **Maintenance Tools...**）を実行することによっておこなう。

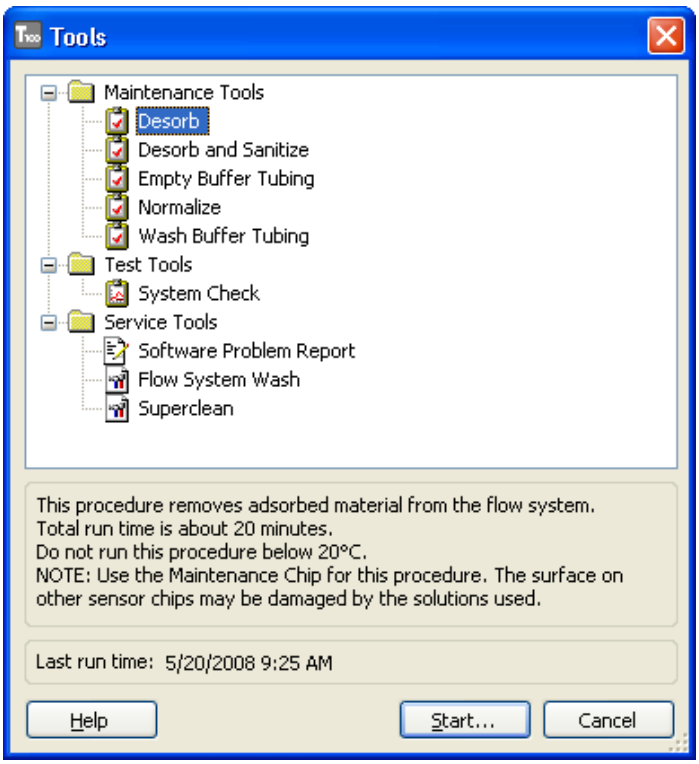
ランニング緩衝液として、超純水を使用する。また、メンテナンス時はメンテナンス用試薬によりセンサーチップ表面に固定化しているリガンドは破壊されてしまうので、必ず **Sensor Chip Maintenance**（もしくは使用済みセンサーチップ）を使用する。
システム温度は、25℃に設定する。

メンテナンスコマンドの呼び出し

Menu bar の **Tools** → **More Tools...**を選択する。

↓

Tools ダイアログが表示される。



各コマンドを選択すると、ウインドウ下部で内容と最終実施日が確認できる。

メンテナンスに必要な試薬

通常のメンテナンスに必要な試薬は、Biacore Maintenance Kit, type 2 （BR-1006-51）に含まれている。

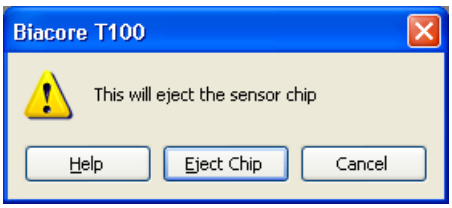
BIAdesorb solution 1		95 ml x 2
BIAdesorb solution 2		95 ml x 2
BIAtest solution		65 ml
BIAdisinfectant solution	（conc. ）	10 ml x 3
BIAnormalizing solution		90 ml
HBS-N Buffer		10 X 50 ml
Sensor Chip Maintenance		1 枚

BIAdesorb solution 1 は 4 ℃で保存すると結晶が析出する。BIAdesorb solution 1 のみ室温保存（その他のキット試薬は、4 ℃保存）。

補足 7-1. メンテナンスチップへの交換方法

Toolbar の **Eject** アイコン（ ）または Menu bar の **Tools** → **Eject Chip...**を選択する。

↓

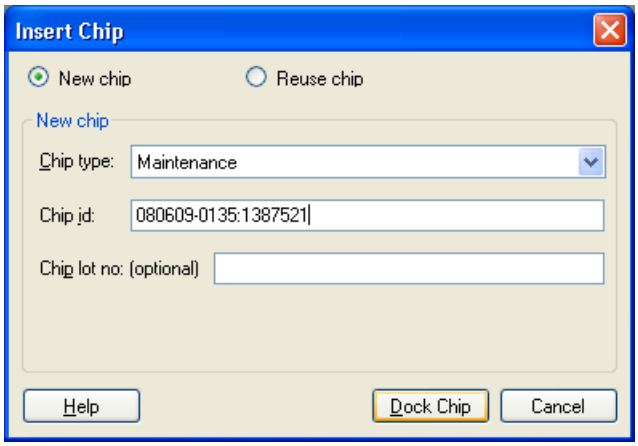


Eject Chip をクリックする。

↓

センサーチップポートが開くのでセンサーチップを取り出し、メンテナンス用センサーチップ（Sensor Chip Maintenance）をセットする。あわせて、ランニング緩衝液ボトルを超純水ボトルに交換する。

↓



Insert Chip ダイアログが表示されるので **Chip type: Maintenance** を選択後、**Chip id;**を入力し、**Dock Chip** をクリックする。

Dock が完了すると自動的に **Standby flow** 状態になる。

Dock 終了後は、超純水で **Prime** を実行する。

7-1. システムの洗浄

7-1-1. Desorb

IFC および、サンプルチューブに付着した汚れ等を洗浄する操作。

1 週間に 1 回必ず実施する。実験内容の変更ごとに実施することを推奨。なお、クルードサンプルや不溶性サンプル利用時には、実験終了後に実施する。所要時間は、約 20 分。20 ℃以上の設定温度でおこなう。（**Sample compartment** 温度も 20 ℃以上）

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS）

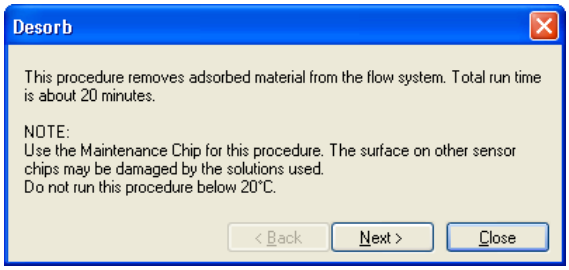
BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）

ランニング緩衝液

チューブ A に超純水をセットする。

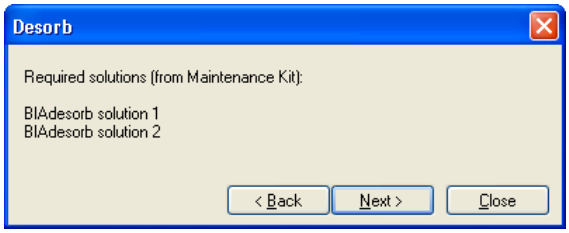
Tools → **More Tools...** → **Maintenance Tools** → **Desorb** を選択し **Start...**をクリックする。

↓


Desorb
This procedure removes adsorbed material from the flow system. Total run time is about 20 minutes.
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
< Back
Next >
Close

内容を確認後、**Next >**をクリックする。

↓



内容を確認後、**Next >**をクリックする。

↓

BIAdesorb solution 1 および、BIAdesorb solution 2 を 16 mm ガラスバイアルまたは、15 mm プラスチックバイアルに、それぞれ 1650 µl 分注してラックポジションにセットする。

Start をクリックする。

↓

Desorb 終了後、装置は自動的に **Standby flow** の状態になる。そのままの状態で 3～4 時間放置か、もしくは **Prime** を 3 回実施する。

7-1-2. Desorb and Sanitize

すべてのフローシステムの滅菌および、洗浄をおこなう。

1 ヶ月に 1 回必ず実施する。所要時間は、約 1 時間。

20 ℃以上の設定温度でおこなう。（サンプルコンパートメント温度も 20 ℃以上）

洗浄したいバッファーチューブ（チューブ A, B, C, D）の洗浄後、A 以外のチューブ（チューブ B, C, D）を空にして終了する。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS）

BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）

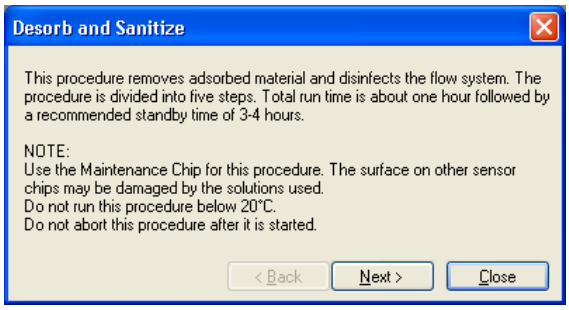
BIAdisinfectant solution　　原液 6 ml を超純水 80 ml に加えて使用

ランニング緩衝液

超純水

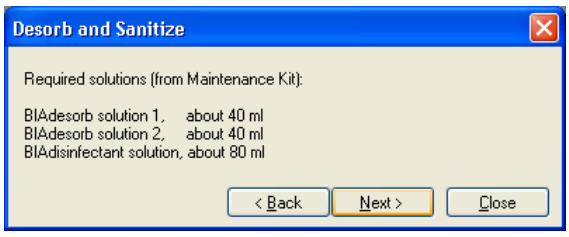
Maintenance Tools → **Desorb and Sanitize** を選択して **Start...**をクリックする。

↓


Desorb and Sanitize
This procedure removes adsorbed material and disinfects the flow system. The procedure is divided into five steps. Total run time is about one hour followed by a recommended standby time of 3-4 hours.
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
Do not abort this procedure after it is started.
< Back
Next >
Close

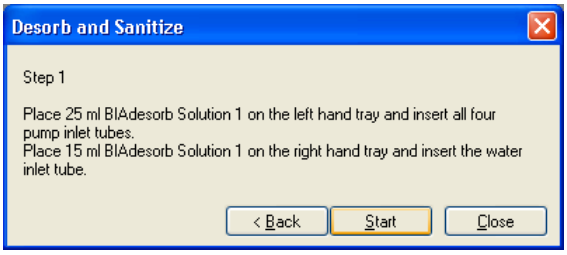
内容を確認後、**Next >**をクリックする。

↓


Desorb and Sanitize
Required solutions (from Maintenance Kit):
BIAdesorb solution 1, about 40 ml
BIAdesorb solution 2, about 40 ml
BIAdisinfectant solution, about 80 ml
< Back
Next >
Close

内容を確認後、**Next >**をクリックする。

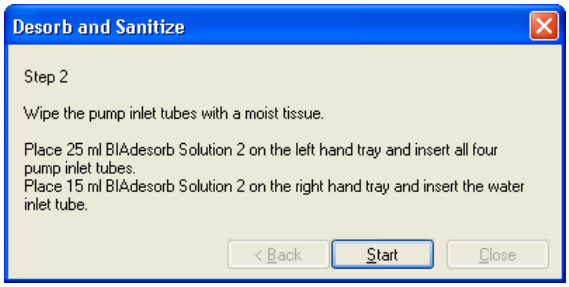
↓


Desorb and Sanitize
Step 1
Place 25 ml BIAdesorb Solution 1 on the left hand tray and insert all four pump inlet tubes.
Place 15 ml BIAdesorb Solution 1 on the right hand tray and insert the water inlet tube.
< Back
Start
Close

BIAdesorb Solution 1 を 25 ml, 15 ml の 2 本に分注する。
本体左側のチューブ A, B, C, D は、すべて BIAdesorb Solution 1 ボトル (25 ml) にセットする。
本体右側の超純水チューブを、BIAdesorb Solution 1 ボトル（15 ml）にセットする。
Start をクリックする。

↓

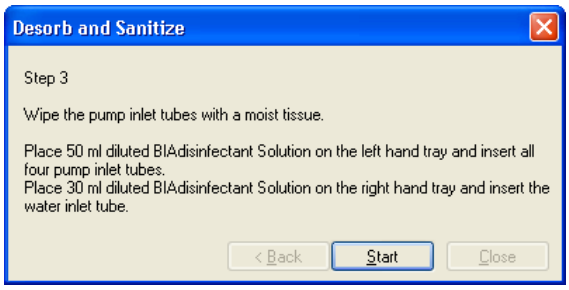
ステップ 1 の終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示される。


Desorb and Sanitize
Step 2
Wipe the pump inlet tubes with a moist tissue.
Place 25 ml BIAdesorb Solution 2 on the left hand tray and insert all four pump inlet tubes.
Place 15 ml BIAdesorb Solution 2 on the right hand tray and insert the water inlet tube.
< Back
Start
Close

BIAdesorb Solution 2 を 25 ml, 15 ml の 2 本に分注する。
チューブ A, B, C, D は、すべて BIAdesorb Solution 2 ボトル（25 ml）にセットする。超純水チューブを、BIAdesorb Solution 2 ボトル（15 ml）にセットする。
Start をクリックする。

↓

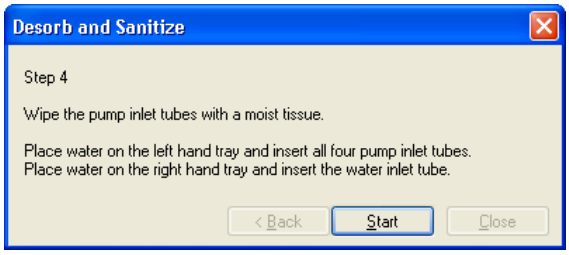
ステップ 2 の終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示される。


Desorb and Sanitize
Step 3
Wipe the pump inlet tubes with a moist tissue.
Place 50 ml diluted BIAdisinfectant Solution on the left hand tray and insert all four pump inlet tubes.
Place 30 ml diluted BIAdisinfectant Solution on the right hand tray and insert the water inlet tube.
< Back
Start
Close

BIAdisinfectant Solution を 50 ml, 30 ml の 2 本に分注する。
チューブ A, B, C, D は、すべて BIAdisinfectant Solution ボトル（50 ml）にセットする。超純水チューブを、BIAdisinfectant Solution ボトル（30 ml）にセットする。**Start** をクリックする。

↓

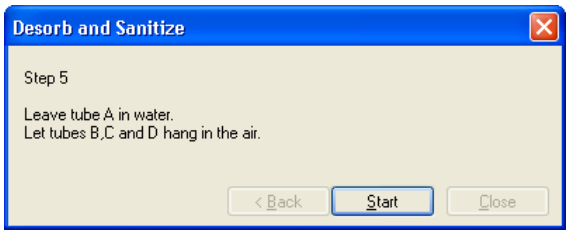
ステップ 3 の終了後、自動的にステップ 4 のダイアログが表示される。



チューブ A, B, C, D は、すべて超純水ボトル（ランニング緩衝液ボトル）に戻す。超純水チューブを、超純水ボトルに戻す。**Start** をクリックする。

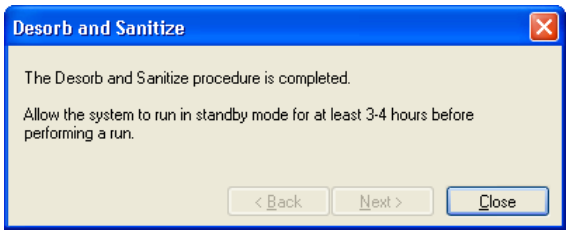
↓

ステップ 4 の終了後、自動的にステップ 5 のダイアログが表示される。



チューブ A は、超純水に残したまま、チューブ B, C, D は、超純水から出して空気を吸える様にする。**Start** をクリックする。

↓



ステップ 5 の終了後、装置は自動的に **Standby flow** の状態になる。この状態で 3～4 時間放置する。もしくは、Prime を 3 回実施する。

↓

チューブ A に HBS-N または HBS-EP+をセットし prime を 1 回実施します。

↓

シャットダウンをする場合は、チューブ A に超純水をセットし prime を 1 回実施します。

↓

Close をクリックし、洗浄は終了です。

7-1-3. Empty Buffer Tubing

B,C および D のバッファーチューブを超純水で洗浄後、チューブの中身を空にする操作。
Buffer scouting またはシステムチェックで B,C および D のチューブを使用後、使用する予定がない場合に実行する。所要時間は、約 20 分。

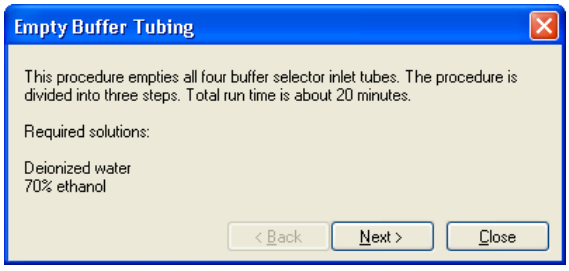
ランニング緩衝液

超純水

70%エタノール溶液

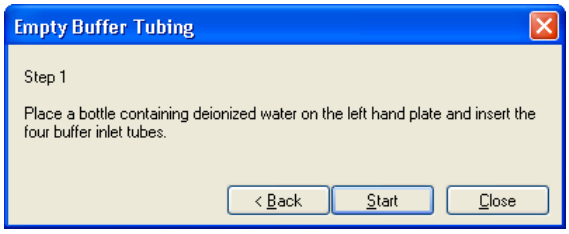
Maintenance Tools → **Empty Buffer Tubing** を選択して **Start...**をクリックする。

↓


Empty Buffer Tubing
This procedure empties all four buffer selector inlet tubes. The procedure is divided into three steps. Total run time is about 20 minutes.
Required solutions:
Deionized water
70% ethanol
< Back
Next >
Close

Next >をクリックする。

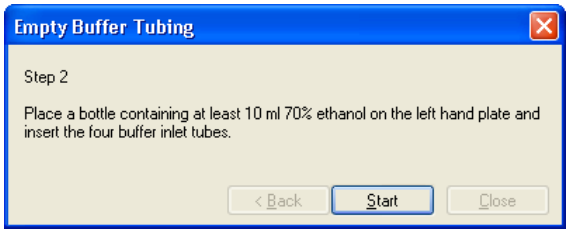
↓


Empty Buffer Tubing
Step 1
Place a bottle containing deionized water on the left hand plate and insert the four buffer inlet tubes.
< Back
Start
Close

本体左側のチューブ A,B,C,D をすべて超純水ボトルにセットする。**Start** をクリックする。

↓

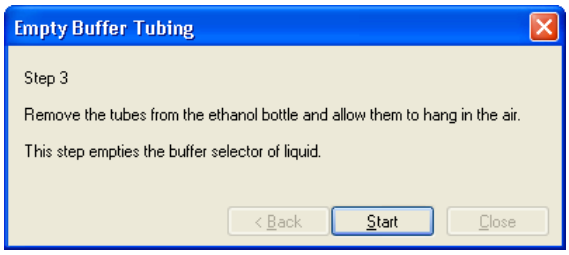
ステップ 1 の終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示される。


Empty Buffer Tubing
Step 2
Place a bottle containing at least 10 ml 70% ethanol on the left hand plate and insert the four buffer inlet tubes.
< Back
Start
Close

本体左側のチューブ A,B,C,D を、すべて 70%エタノール溶液(10 ml)のボトルにセットする。
Start をクリックする。

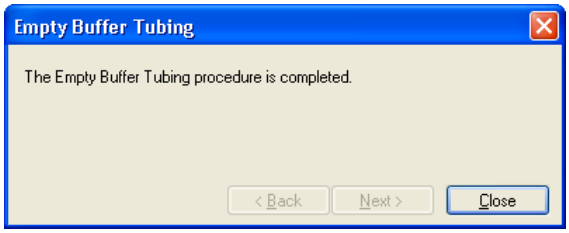
↓

ステップ 2 の終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示される。



本体左側のチューブ A,B,C,D を、70%エタノールから出して空気を吸えるようにする。
Start をクリックする。

↓



Close をクリックする。B,C および D のチューブは、キムワイプで拭いて、チューブホルダーに収納する。

7-1-4. Wash Buffer Tubing

A,B,C,D のバッファーチューブを洗浄する操作。

界面活性剤または BSA 等、吸着しやすい物質を含んだランニング緩衝液を使用後、それらの物質を含んでいないランニング緩衝液に切り替えて実験する場合に実行する。

所要時間は、約 30 分。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS）

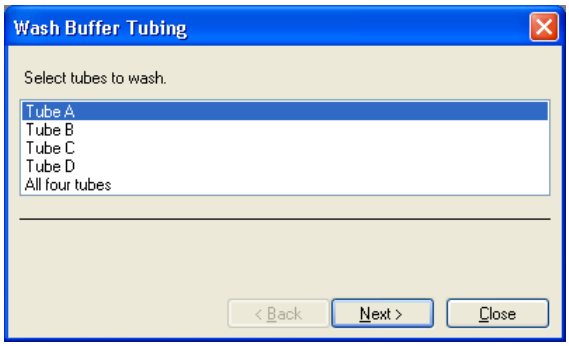
BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）

ランニング緩衝液

超純水

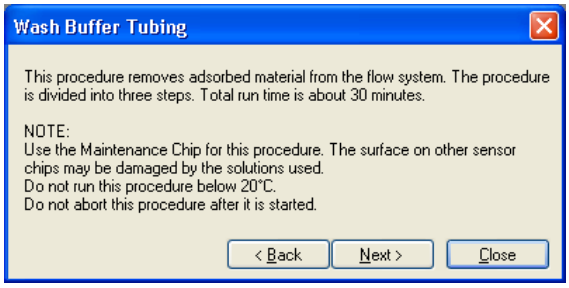
Maintenance Tools → **Wash Buffer Tubing** を選択して **Start...**をクリックする。

↓



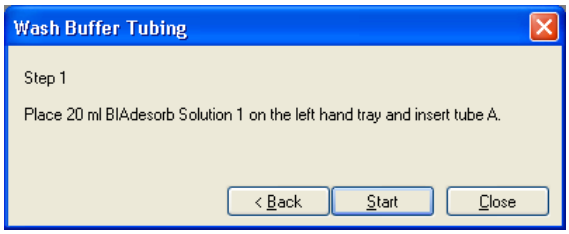
洗浄するチューブを選択し、**Next >**をクリックする。

↓


Wash Buffer Tubing
This procedure removes adsorbed material from the flow system. The procedure is divided into three steps. Total run time is about 30 minutes.
NOTE:
Use the Maintenance Chip for this procedure. The surface on other sensor chips may be damaged by the solutions used.
Do not run this procedure below 20°C.
Do not abort this procedure after it is started.
< Back
Next >
Close

内容を確認後、**Next >**をクリックする。

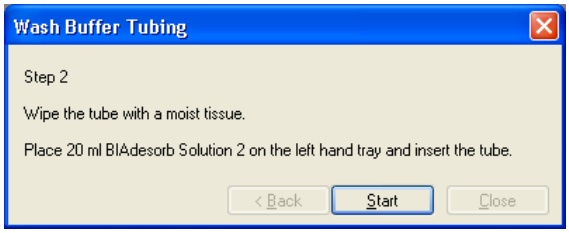
↓



最初に選択したチューブを BIAdesorb Solution 1（20 ml）ボトルに入れ、**Start** をクリックする。

↓

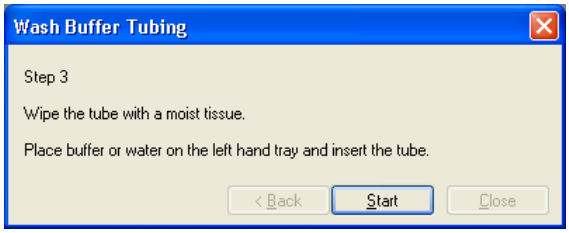
ステップ 1 の終了後、自動的にステップ 2 のダイアログが表示される。



チューブを BIAdesorb Solution 2（20 ml）ボトルに入れ、**Start** をクリックする。

↓

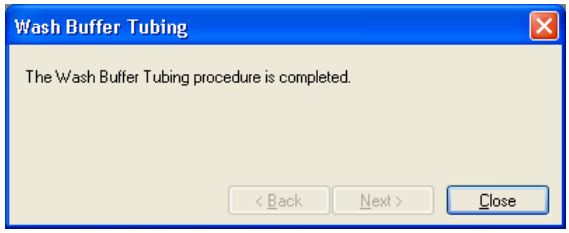
ステップ 2 の終了後、自動的にステップ 3 のダイアログが表示される。



チューブを超純水ボトルに入れ、**Start** をクリックする。

↓

ステップ 3 終了後、自動的に以下のダイアログが表示される。



Close をクリックする。

使用しないチューブはチューブホルダーに収納する。

7-2. シグナルの校正

7-2-1. Normalize

センサーチップを新規にセットした際に実施することを推奨する。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAnormalizing solution

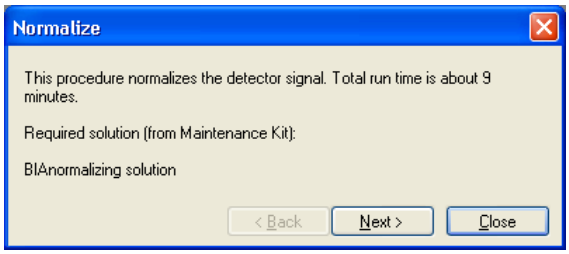
センサーチップおよびランニング緩衝液

実験に利用するセンサーチップおよびランニング緩衝液

Menu bar の **Tools** → **More Tools...** → **Maintenance Tools...**をクリックする。

Normalize を選択し、**Start...**をクリックする。

↓

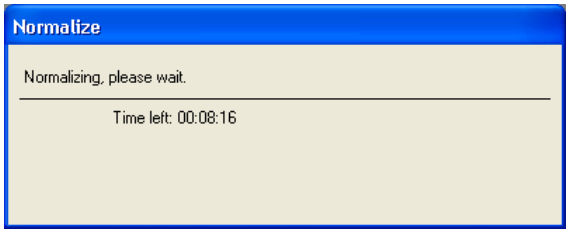

Normalize
This procedure normalizes the detector signal. Total run time is about 9 minutes.
Required solution (from Maintenance Kit):
BIAnormalizing solution
< Back
Next >
Close

Next >をクリックする。

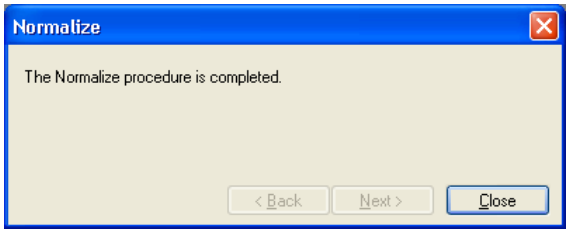
↓

バイアルをセット後、**Start** をクリックする。

↓



終了後、下記ダイアログが表示される。



自動的に **Standby flow** 状態になる。

7-3. システムチェック

装置の診断をおこなうプログラムである。このプログラムは Desorb and Sanitize による洗浄後に実行する。シグナルのドリフトや、エアースパイクの混入が激しい場合等に実施する。使用頻度が高い場合、定期的に実行することを推奨する。所要時間は、約 1 時間。

試薬

Biacore Maintenance Kit, type 2

BIAtest solution

ランニング緩衝液

HBS-N Buffer 150 ml 程度　　メンテナンスキットの 10X Buffer を希釈して使用

超純水

必要な消耗品

新品の Series S Sensor Chip CM5

BIAtest solution

1.5 ml プラスチックバイアル

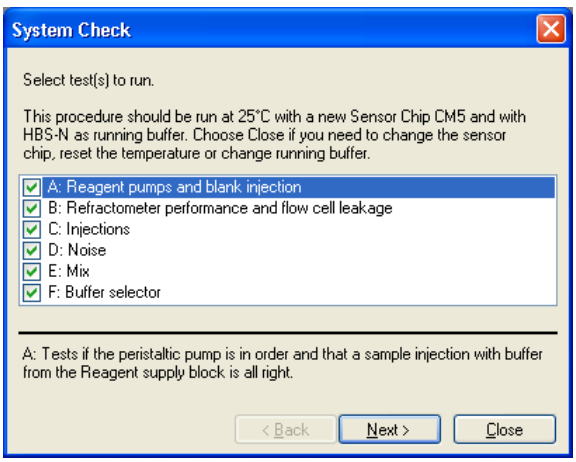
新品のセンサーチップ CM5 を Dock 後、HBS-N 緩衝液で Prime をおこなう。

Menu bar の **Tools** → **More Tools...**を選択する。

↓

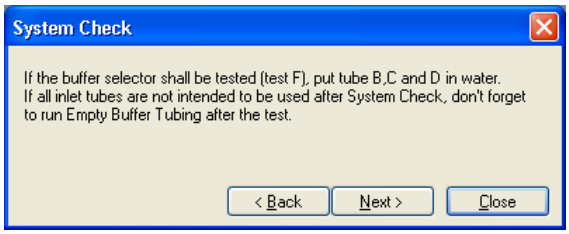
Test Tools → **System Check** を選択して **Start...**をクリックする。

↓


System Check
Select test(s) to run.
This procedure should be run at 25°C with a new Sensor Chip CM5 and with HBS-N as running buffer. Choose Close if you need to change the sensor chip, reset the temperature or change running buffer.
A: Reagent pumps and blank injection
B: Refractometer performance and flow cell leakage
C: Injections
D: Noise
E: Mix
F: Buffer selector
A: Tests if the peristaltic pump is in order and that a sample injection with buffer from the Reagent supply block is all right.
< Back
Next >
Close

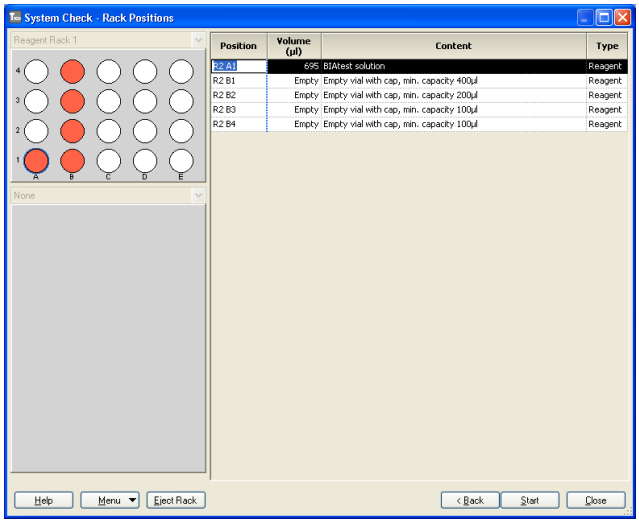
System Check ダイアログが表示される。全項目にチェックをつけて、**Next >**をクリックする。Buffer scouting 機能の試験の必要がなければ、F の試験項目のチェックは外す。

↓


System Check
If the buffer selector shall be tested (test F), put tube B,C and D in water.
If all inlet tubes are not intended to be used after System Check, don't forget to run Empty Buffer Tubing after the test.
< Back
Next >
Close

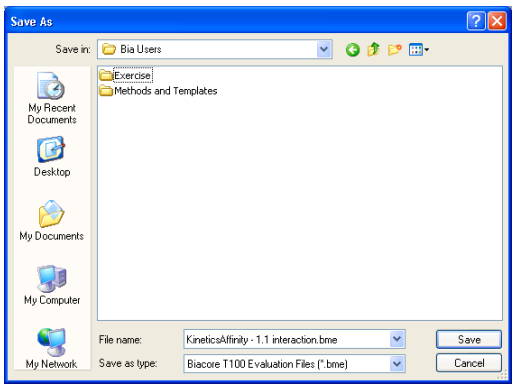
A のチューブを HBS-N Buffer 10X を希釈したボトルに、B,C および D のチューブを超純水の入ったボトルに差し込む。（Buffer Scouting 機能のテストが必要なければ、B,C,D のチューブを超純水に入れる必要はない。）
Next >をクリックする。

↓


System Check - Rack Positions
Reagent Rack 1
Position
Volume (µl)
Content
Type
R2 A1 695 BIAtest solution Reagent
R2 B1 Empty Empty vial with cap, min. capacity 400µl Reagent
R2 B2 Empty Empty vial with cap, min. capacity 200µl Reagent
R2 B3 Empty Empty vial with cap, min. capacity 100µl Reagent
R2 B4 Empty Empty vial with cap, min. capacity 100µl Reagent
None
Help
Menu
Eject Rack
< Back
Start
Close

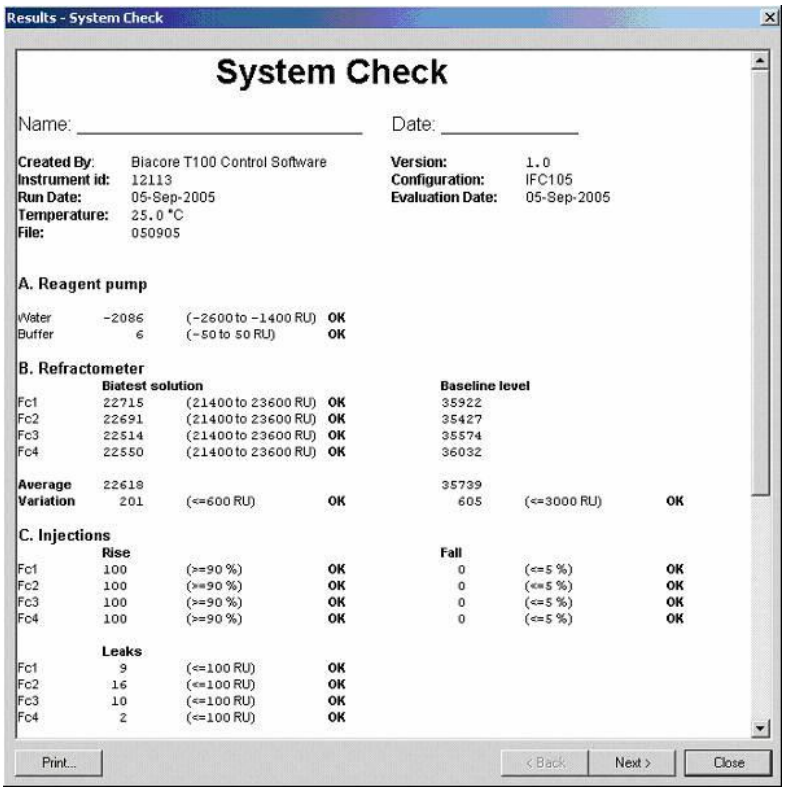
BIAtest Solution を、1.5 ml プラスチックバイアルに 695 µl 分注してラックポジションにセットする。また、空の 1.5 ml プラスチックバイアル 4 本をラックポジションにセットし、**Start** をクリックする。

↓



続いて、測定結果の保存先を指定する。**File name** を入力して、**Save** すると測定がスタートする。システムチェックを実行後、B,C および D のチューブを使用しない場合は **Empty Buffer Tubing** を実行すること。

↓



測定が終了すると、チェック結果が自動的に表示される。各チェック項目について測定値が正常値範囲内であれば“**OK**”、範囲外であれば“**BAD**”と診断される。**BAD** が表示されている項目がある場合には弊社技術サービス部に連絡する。

8. 実験の終了

実験が終了した際には、次のいずれかの方法でシステムを維持する。

スタンバイ状態で放置　　4 日以内に使用する場合

電源を落として終了　　4 日以上使用しない場合

8-1. スタンバイ状態での放置

測定を終了すると自動的に **Standby flow** 状態になる。

チューブ A にセットしたランニング緩衝液で、65 ml/ 24 時間の流速を最長 4 日間継続する。

ランニングバッファーを涸らさないように注意する。廃液ボトルの空き容量にも注意する。

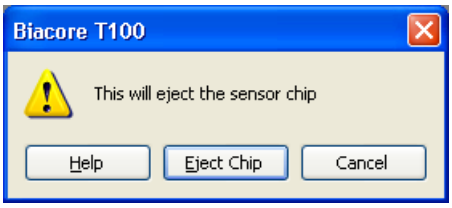
スタンバイ状態であるか否かは、**Status bar** で確認できる。

8-2. 電源の落とし方

電源を落とす前には、メンテナンスを実行すること。第 7 章参照。

Toolbar の **Eject** アイコン（ ）または Menu bar の **Tools** → **Eject Chip...**を選択する。

↓



Eject Chip をクリックする。

↓

センサーチップポートが開くのでセンサーチップを取り出し、Biacore T100 control software を終了する。パソコンのシャットダウン、Biacore T100 の本体電源を落とす。

注意）電源を落とす場合は、システム内部が超純水で置き換わっているかどうか確認の上、電源を落とすこと。

8-3. センサーチップの保存

取り出したセンサーチップは、以下の 2 つの方法で保存する。
リガンドは保存中に変性する可能性があるので、再使用の際にはポジティブコントロールサンプルのレスポンスからリガンドの活性を確認する。

ドライ状態での保存

取り出したセンサーチップにパラフィルムを巻いて 4℃で保存する。
安定なサンプルを固定したセンサーチップの保存に用いる。

ウェット状態での保存

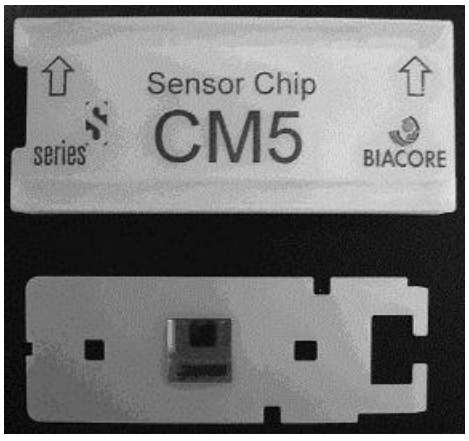
取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを容器（50 ml 容のふた付きプラスチック遠心チューブ等）に分注した HBS-EP+等の緩衝液に浸し、4 ℃で保存する。

シートの取り出しと保存

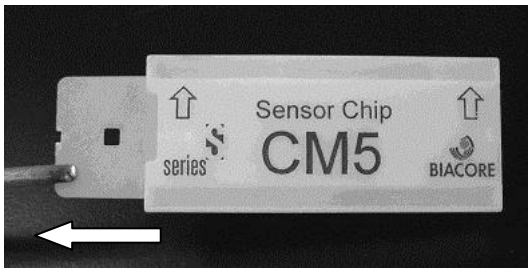
センサーチップはカバーとシートから構成されている。

カバー

シート



シートの金基板の窪んでいる面はリガンドが固定化されている。
平らな面は検出器が接触する。リガンド固定化面には触れないよう注意する。
下図のようにピンセットにてシートを抜き出し、緩衝液に浸して保存する。



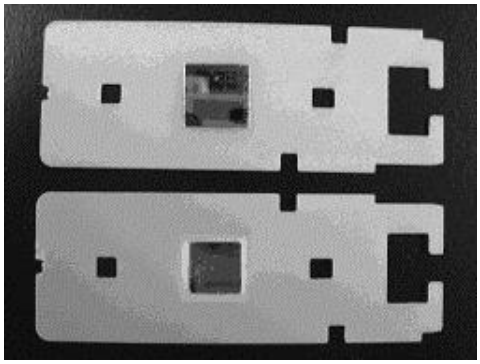
保存していたシートからの緩衝液成分の除去とカバーへの収納

再利用する際は、緩衝液に浸していたシートをカバーに収める。シートの水分を取り除いてからカバーに収める。

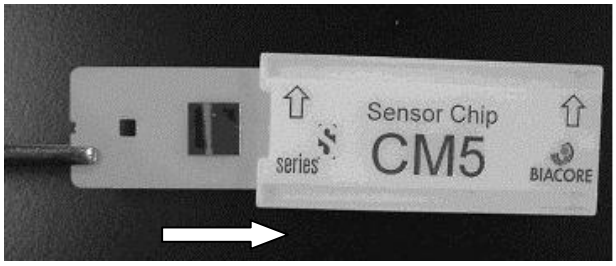
プラスチックの部分および検出面	キムワイプで拭き、超純水で湿らせたキムワイプで再度拭く。さらに乾いたキムワイプで拭く。
固定化面	キムワイプなどを“こより状”に細くして、金基板の中央部分に触れないように、四隅から水分を吸収する。

検出面

固定化面



埃に注意しながらカバーに収める。下図のように、検出面が表になる向きで、ピンセットにてカバーの左側から挿入する。
リガンド固定化面を表にして挿入した場合には最後までシートが入らない。

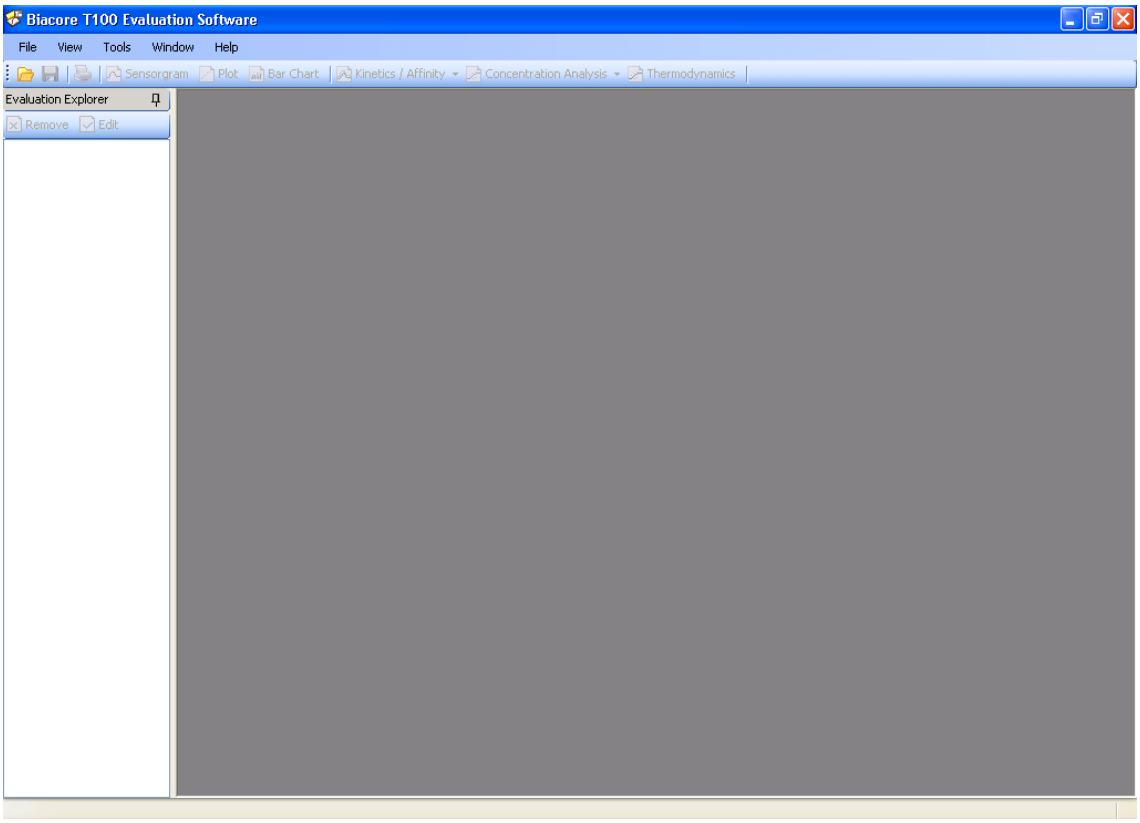


9. センサーグラムの編集

ウィザードまたはメソッドを用いた測定プログラム終了後、Biacore T100 Evaluation Software は自動的に立ち上がり、取得データは編集解析に向け開かれる。過去に取得したデータを編集解析する場合は、Evaluation ソフトウェアを起動し、ファイルの呼び出しからおこなう。

9-1. ソフトウェアの起動

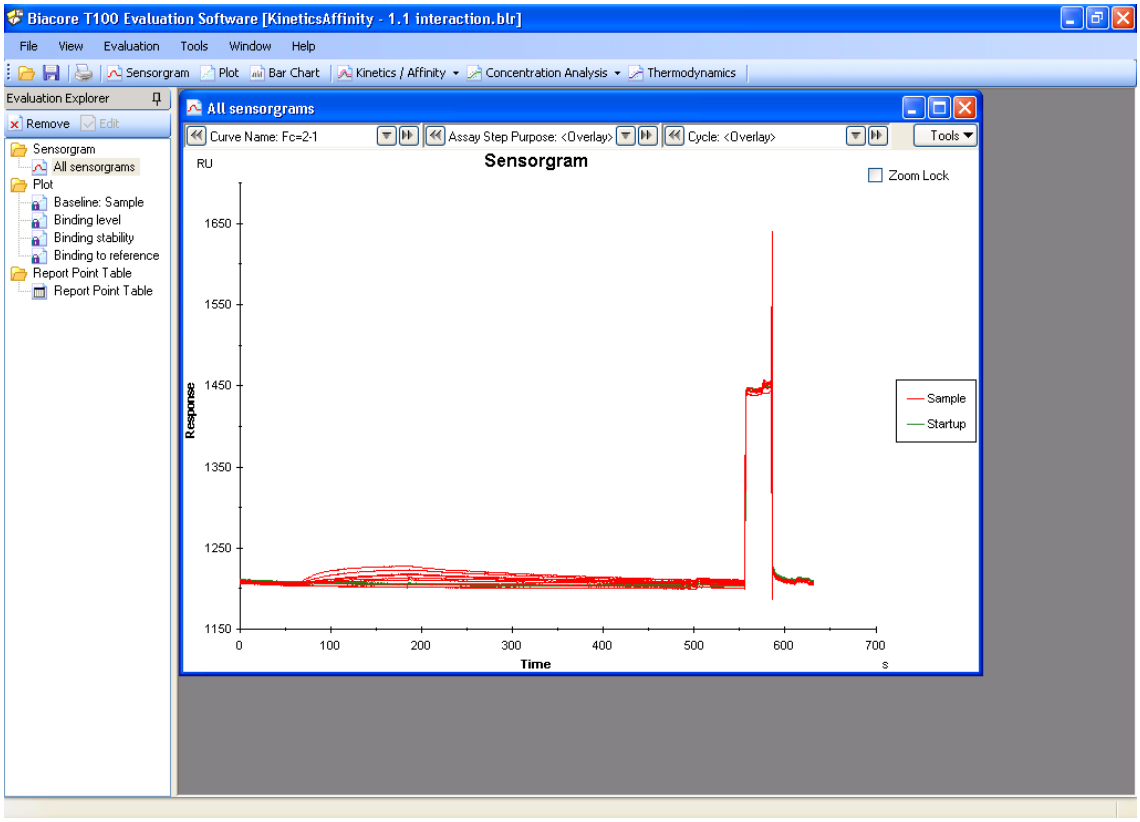
画面左下の **Start** → **BIAprograms** → **Biacore T100 Evaluation Software** をクリックする。



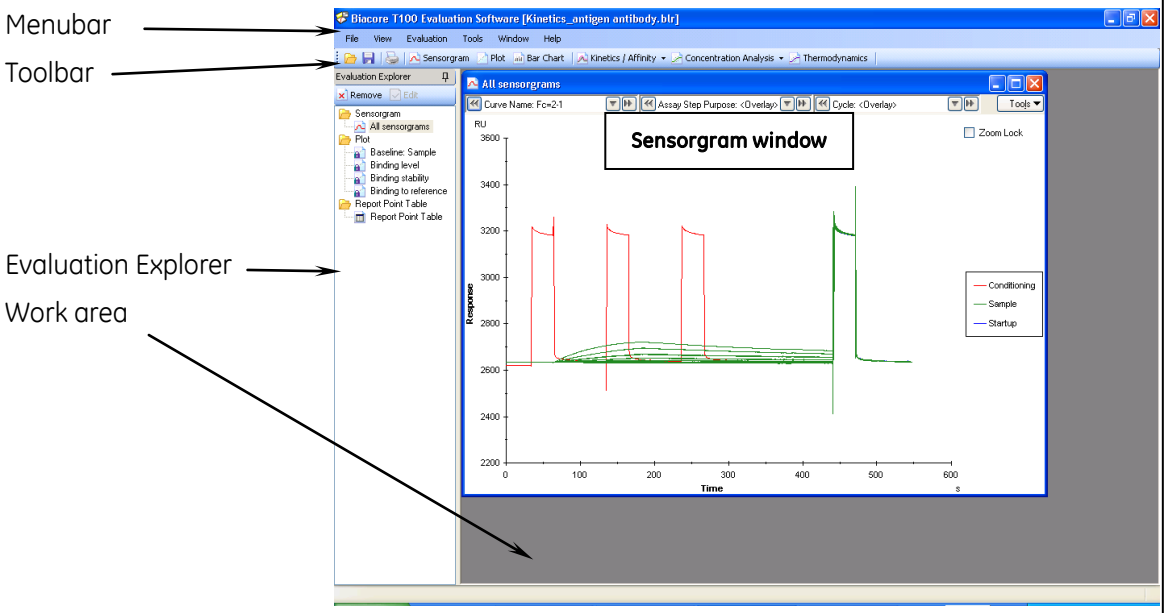
9-2. ファイルの呼び出し

アイコン（ ）もしくは **File** → **Open...**をクリックし、目的のファイルを選択する。（通常、ファイルは、C:/BIA users/に保存されている。）
ここでは、練習用データ C:/BIA users/T100 demo File / Binding Analysis を選択する。
OK をクリックする。

↓



補足 9-1. 画面の説明



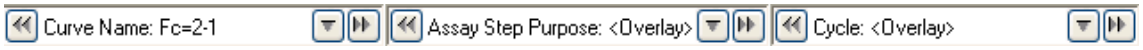
Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

9-3. センサーグラムの編集

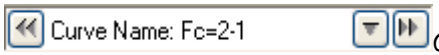
Evaluation Explorer で Sensorgram フォルダから、All sensorgrams をクリックし、Work area 内に Sensorgram window を表示する。

9-3-1. センサーグラムの表示

Sensorgram window 上部のセレクションツールを使用する。

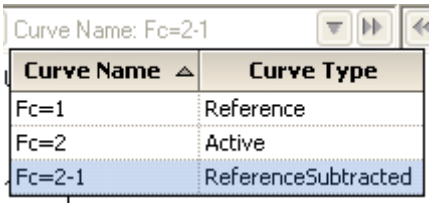


フローセル別センサーグラムの選択

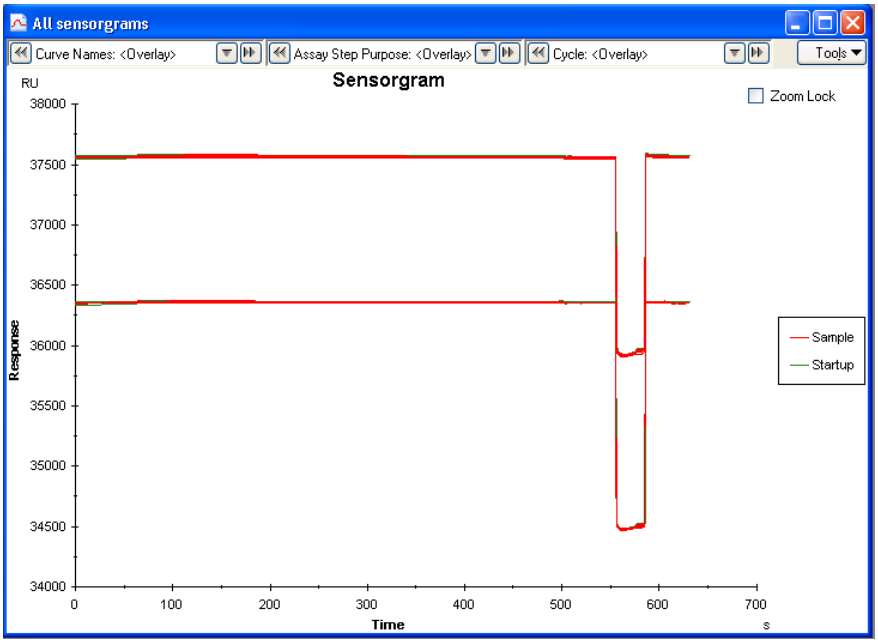


の もしくは をクリックし、目的のフローセルを選択する。

複数のフローセルを同時に選択する場合は、 を使用する。



キーボードの Ctrl キーを押しながら、目的のフローセルをクリックする。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能である。



特定のセンサーグラムの選択

Cycle: <Overlay>　　の もしくは をクリックし、目的のサイクルを選択する。

↓

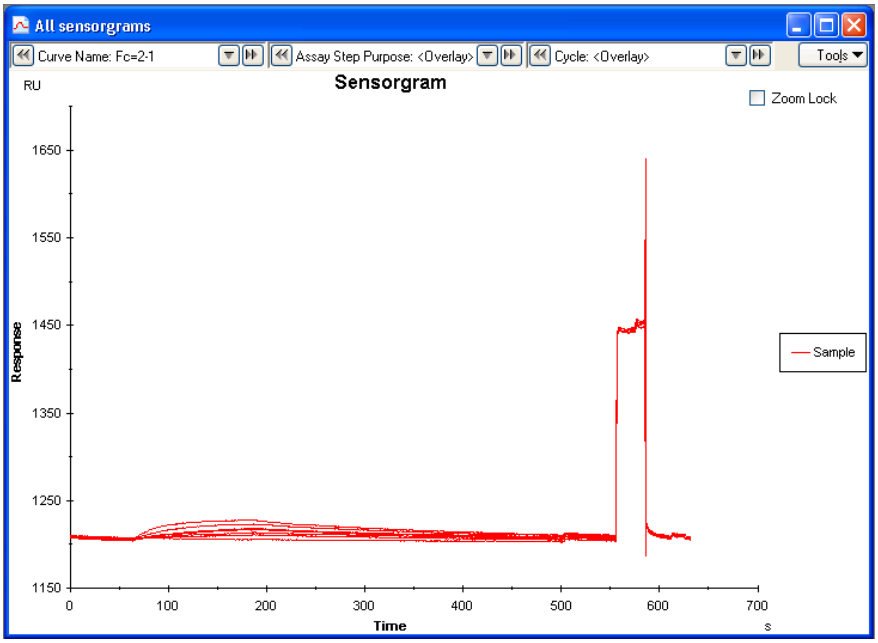
複数のサイクルを同時に選択する場合は、 を使用する。

Assay Step Purpose: <Overlay>　Cycle: <Overlay>

Included	Cycle#	Assay Step Purpose	Sample Name	Conc.	MW
Yes	1	Startup	Buffer		
Yes	2	Startup	Buffer		
Yes	3	Startup	Buffer		
Yes	9	Sample	Beta2micro	32	11800
Yes	8	Sample	Beta2micro	16	11800
Yes	7	Sample	Beta2micro	8	11800

キーボードの **Ctrl** キーを押しながら、目的のサイクルをクリックする。連続したフローセルを選択する場合は、マウスのドラッグ操作によっても可能である。

↓



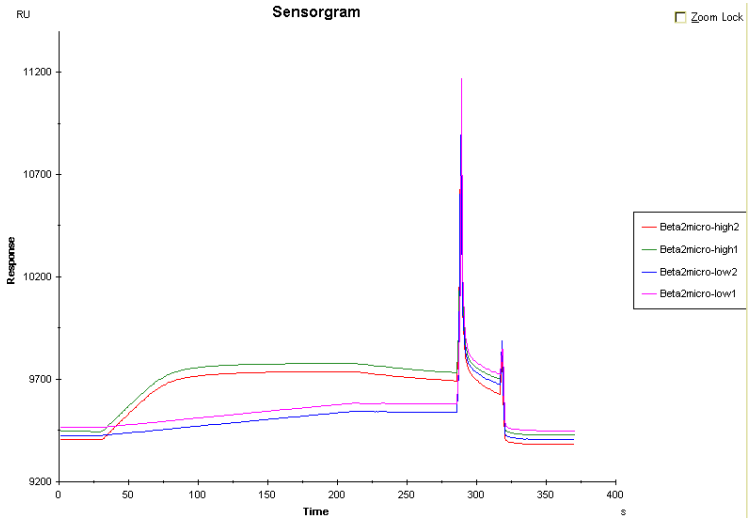
9-3-2. センサーグラムの表示の変更

Sensorgram window 上部のセレクションツールの右端にある Tools を使用する。

色の表示の変更

Tools → Color By → Sample をクリックする。

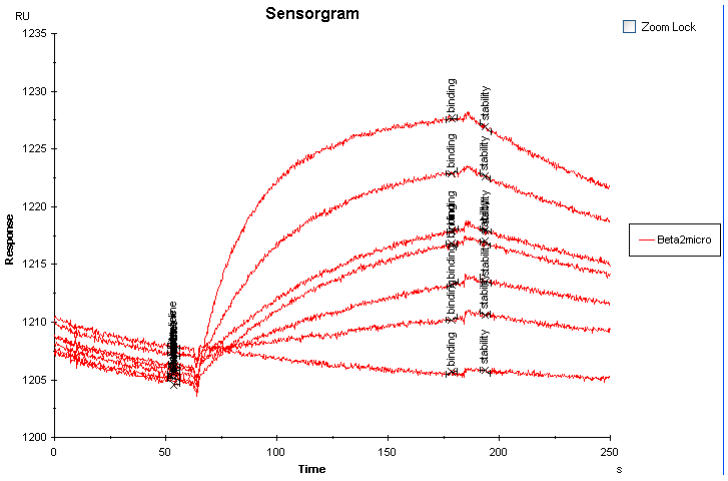
サンプル名ごとに、自動的にセンサーグラムの色が変更する。



その他、測定温度ごとやフローセルごとにも色を変更することができる。

レポートポイントの表示

Tools → Report Point → Id and Marker をクリックする。

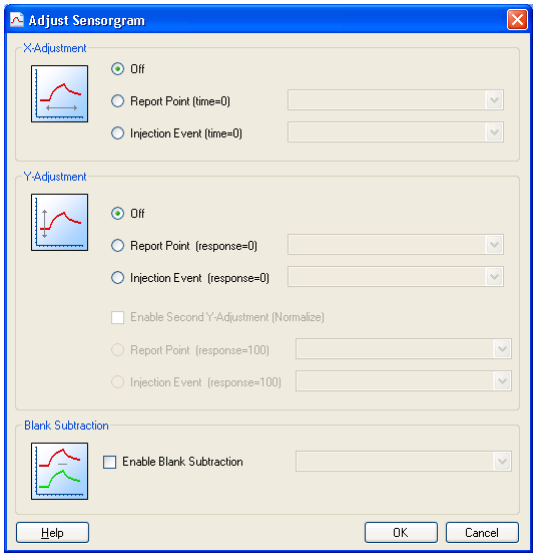


レポートポイントの id が表示される。

9-3-3. センサーグラムの添加開始時間、ベースラインあわせ

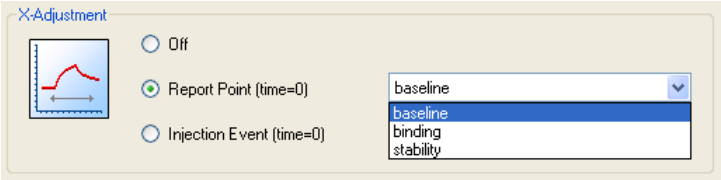
Sensorgram window 上部のセレクションツールの右端にある Tools を使用する。

Tools → Sensorgram Adjustment...をクリックする。

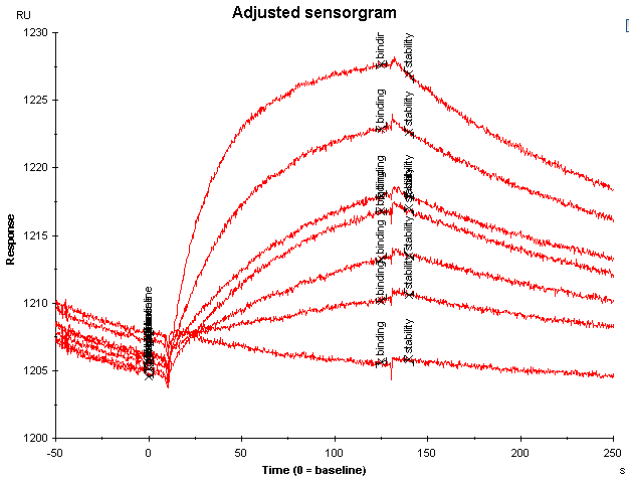


サンプル添加開始時間あわせ

X-Adjustment v に Report point （time=0）をクリックし、 で baseline を選択する。

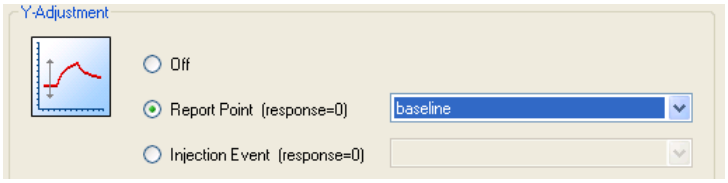


OK をクリックする。

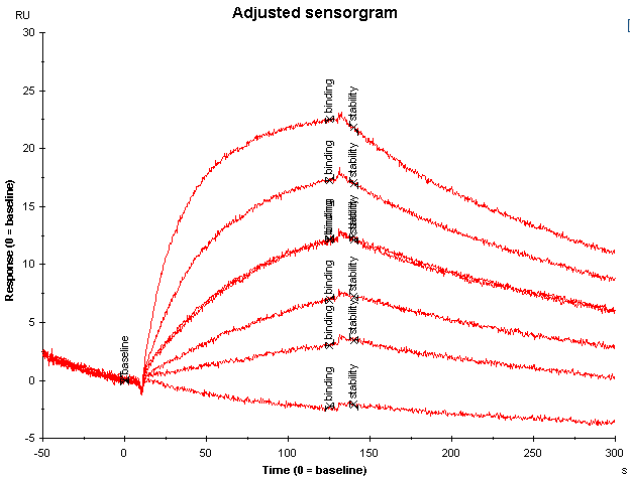


ベースラインあわせ

Y-Adjustment も同様に、Report point （response=0）をクリックし、で baseline を選択する。 OK をクリックする。

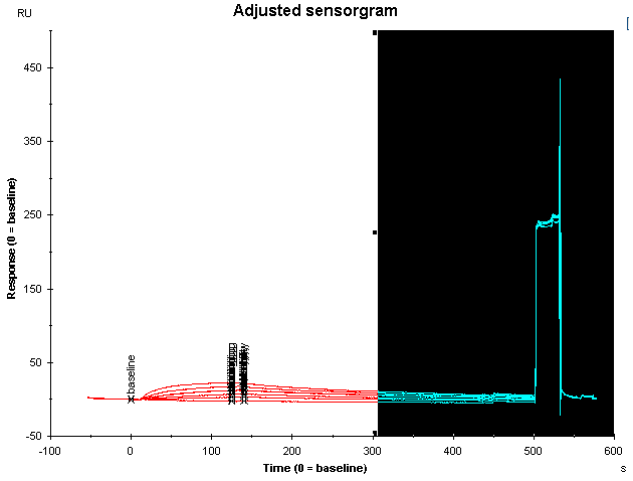


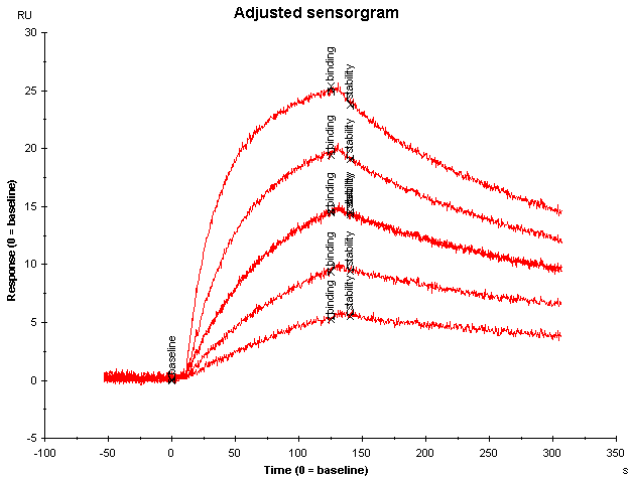
OK をクリックする。



9-3-4. センサーグラムの不必要部分の削除

削除する範囲を、マウスを右クリックしたままドラッグし選択する。

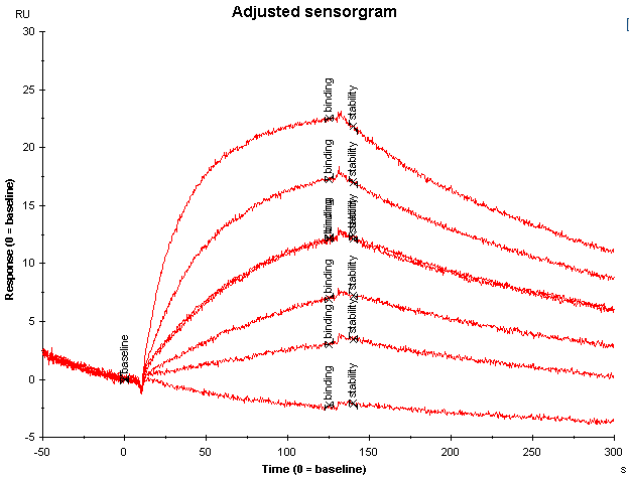




選択した範囲が削除される。

9-3-5. センサーグラムの差し引き

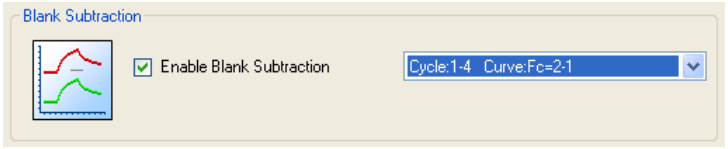
差し引きしたいセンサーグラム（ブランク）と、差し引くセンサーグラムを重ね書きする。
ブランクのセンサーグラムの上にポインターを移動して表示されるサイクル数を確認する。



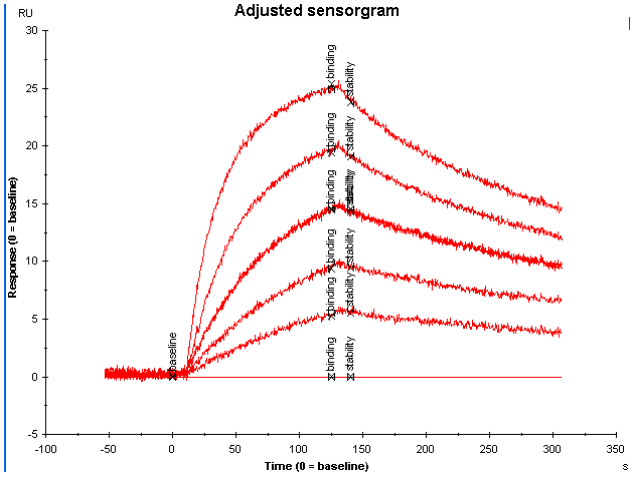
Sensorgram window 上部のセレクションツールの右端にある

を使用する。

Tools → **Sensorgram Adjustment...**をクリックする。



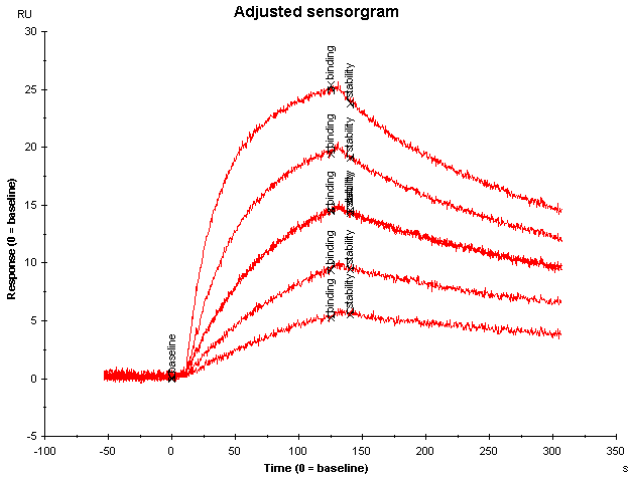
Blank Subtraction の **Enable Blank Subtraction** にチェックを入れ、
をクリックしてブランクのセンサーグラムを選択する。



ブランクのセンサーグラムは直線に変わる。

9-3-6. センサーグラムのノーマライズ

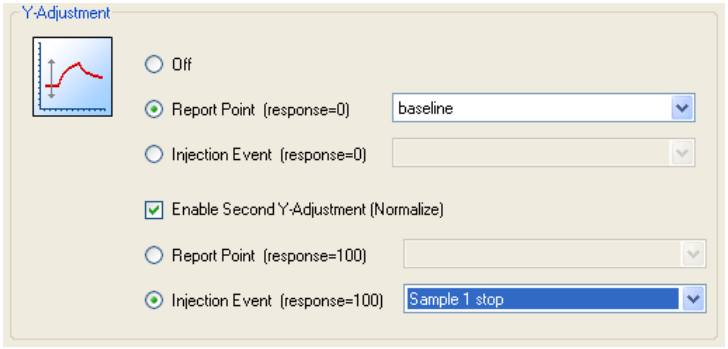
指定した結合量を基準として、結合量の 100 あわせをおこなうことをノーマライズと呼ぶ。
解離速度の比較をおこなう際などに利用する。
添加開始およびベースラインのゼロあわせをおこなったセンサーグラムを用いて実施する。



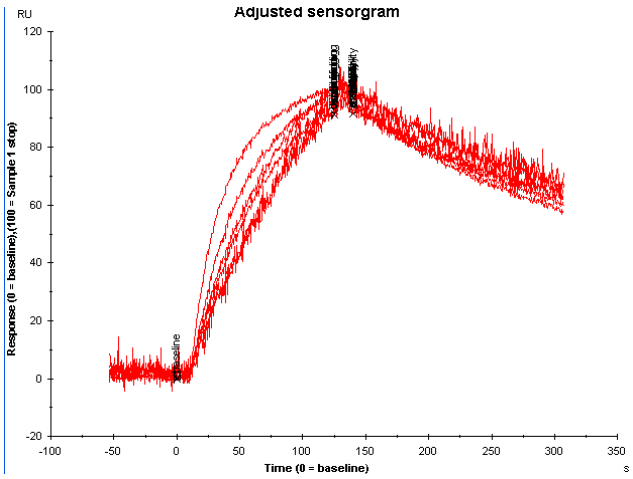
Sensorgram window 上部のセレクションツールの右端にある

を使用する。

Tools → Sensorgram Adjustment...をクリックする。



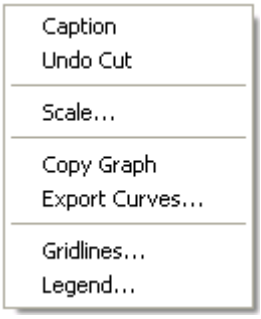
Enable Second Y-Adjustment （Normalize）にチェックを入れる。解離速度定数の比較をおこなう場合には、**Injection Event （respons = 100）**を選択して、をクリックして添加終了（Sample 1 stop）を選択する。**OK** をクリックする。



添加終了時点の結合量を 100RU として、ノーマライズ後のセンサーグラムが表示される。

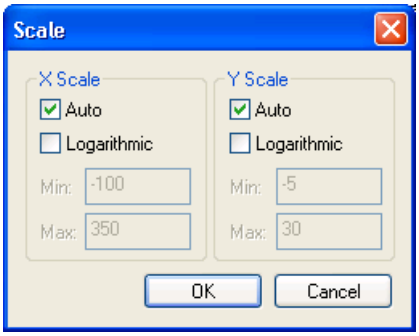
9-4. グラフの編集

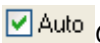
Sensorgram window 上のマウスの右クリックメニューを使用する。



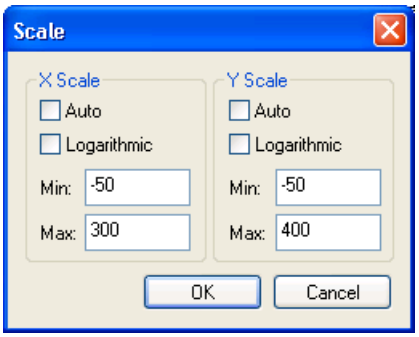
スケールの変更

Scale...



通常 Auto が選択されている。スケールを変更する場合は、 

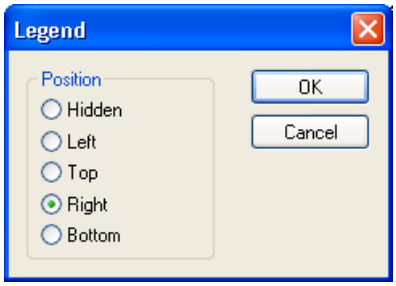
のチェックを外し、各軸のスケールの最小値（Min:）と最大値（Max:）を入力する。



OK をクリックする。

凡例の移動と削除

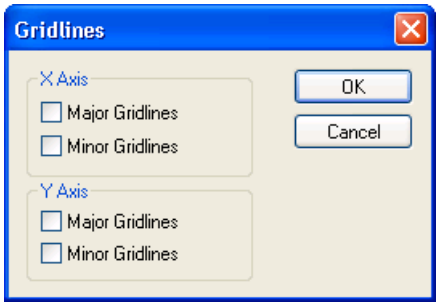
Legend…



通常 **Right** が選択されている。移動する位置を選択する。凡例をグラフに表示しない場合は、**Hidden** を選択する。**OK** をクリックする。

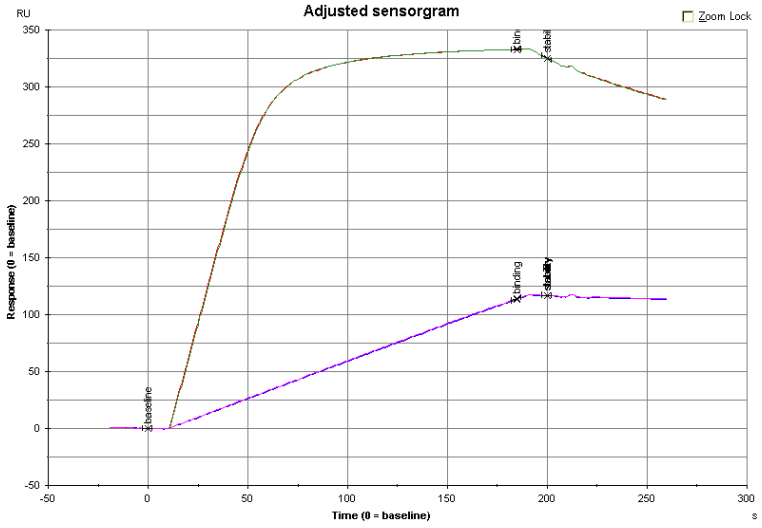
グリッドラインの表示

Gridlines…



主軸目盛りに対してグリッドラインを表示させるときは、Major Gridlines にチェックを入れる。副目盛りに対してグリッドラインを表示させるときは、Minor Gridlines にチェックを入れる。

OK をクリックする。

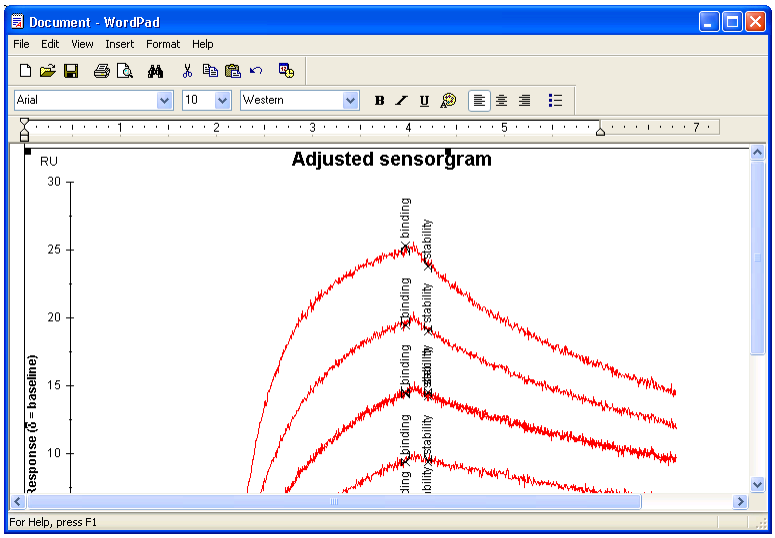


9-5. データの移管

データの移管方法には、次の方法がある。
①画像データファイルとして移管
②テキスト形式ファイルとして移管
③Excel 形式ファイルとして移管

画像データファイルとして移管

Sensorgram window 上のマウスの右クリックメニューを使用する。
Copy Graph をクリックする。
グラフを画像としてコピーする。続いて Biacore 付属のパソコンにインストールされている Word Pad、Paint などに貼り付け、貼り付けたファイルを保存する。保存したファイルは、画像として別のパソコンに移動させることが可能となる。
（例）Word Pad への貼り付け



センサーグラムをテキスト形式ファイルとして移管

Sensorgram window 上のマウスの右クリックメニューを使用する。
Export Curves...をクリックする。

↓

保存先を指定して保存する（拡張子：txt）。保存したファイルは、他のパソコンの Excel 等のグラフ描画機能を持つソフトウェアで再びセンサーグラムを作成することが可能である。

（例）保存した text ファイル

Beta2micro-high2_X	Beta2micro-high2_Y	RPoint_X	RPoint_Y	Beta2micro-hi
-19 0.558594	-3 0.0712891	-19 0.833984	-3 0.0576172	
-18 0.533203	0 0	-18 0.761719	0 0	-18 0.745
-17 0.5625 2	-0.0820313	-17 0.779297	2 -0.102539	-17
-16 0.457031	182 332.89	-16 0.740234	182 332.645	-16 0.608
-15 0.417969	185 333.021	-15 0.712891	185 332.791	-15 0.538
-14 0.411133	187 332.999	-14 0.701172	187 332.898	-14 0.501
-13 0.400391	197 327.708	-13 0.618164	197 327.761	-13 0.421
-12 0.310547	200 325.22	-12 0.567383	200 325.211	-12 0.355
-11 0.216797	202 323.455	-11 0.496094	202 323.496	-11 0.458
-10 0.198242		-10 0.349609		-10 0.431
-9 0.182617		-9 0.414063		-9 0.332
-8 0.25293	-8 0.391602		-8 0.436523	
-7 0.181641		-7 0.267578		-7 0.291
-6 0.143555		-6 0.24707	-6 0.204102	
-5 0.0888672		-5 0.15332	-5 0.126953	
-4 0.178711		-4 0.170898		-4 0.122
-3 0.0712891		-3 0.0576172		-3 0.095
-2 0.0488281		-2 0.0605469		-2 -0.03
-1 0.0195313		-1 0	-1 -0.0488281	
0 0	0 0		0 0	
1 -0.0283203		1 -0.0517578		1 -0.11
2 -0.0820313		2 -0.102539		2 -0.15
3 -0.169922		3 -0.194336		3 -0.13
4 -0.130859		4 -0.303711		4 -0.15

解析データを Excel 形式ファイルとして移管

File → Export → Result To Excel...をクリックする。

保存先を指定して保存する（拡張子：xls）。Evaluation Explorer に表示されている解析結果の数値データなどが保存される。ただし、センサーグラムのデータは保存されない。

他のパソコンの Excel で解析結果を開くことができる。

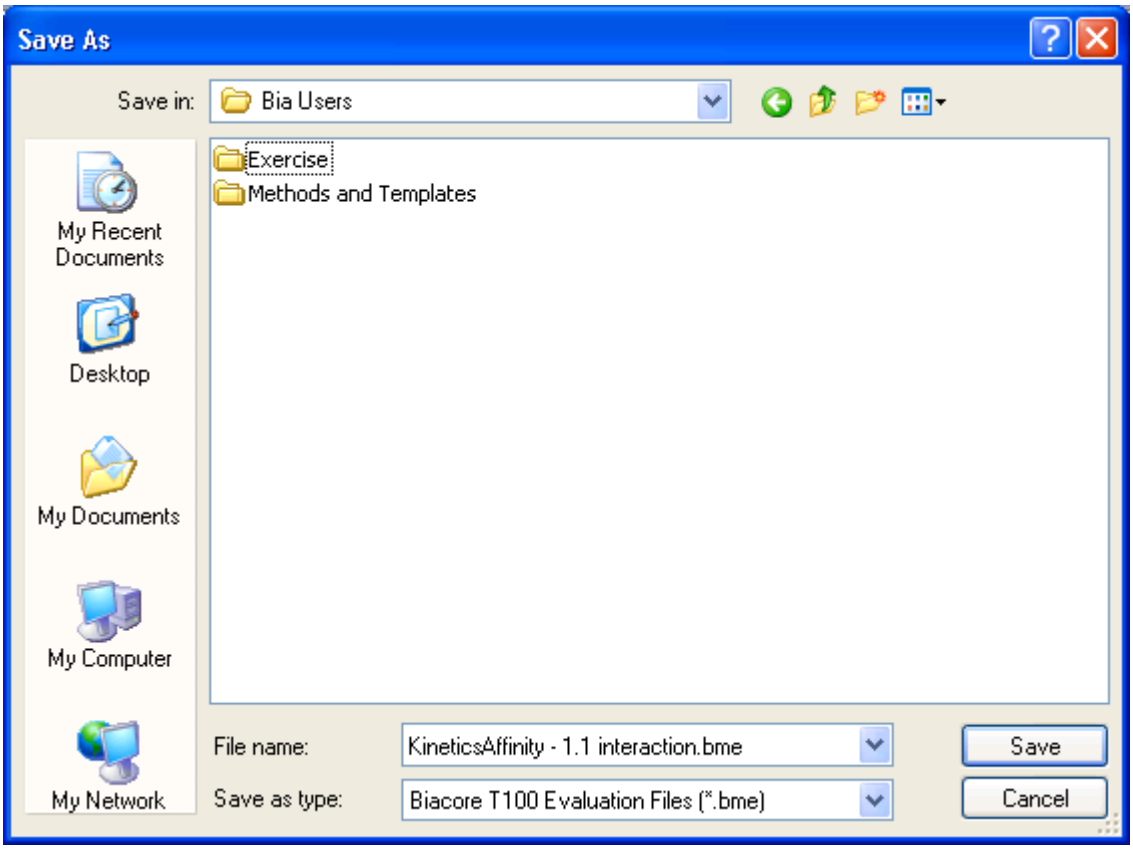
（例）保存した xls ファイル

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	Evaluation	Kinetics / Affinity													
2	Name:	Beta2micro													
3															
4	Sample:	Beta2micro													
5	Temperatu	25													
6	Curve:	Fc=2-1													
7															
8	Model:	1:1 Binding													
9	Description:														
10															
11	Curve	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Conc (M)	tc	Flow (ul/m	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU)				
12		1147601	0.002635	2.3E-09	24.50454		1.17E+09				0.136664				
13	Cycle: 5	2 nM				2E-09		30	3.63E+09	0.178485					
14	Cycle: 6	4 nM				4E-09		30	3.63E+09	0.31193					
15	Cycle: 7	8 nM				8E-09		30	3.63E+09	0.113137					
16	Cycle: 8	16 nM				1.6E-08		30	3.63E+09	0.242235					
17	Cycle: 9	32 nM				3.2E-08		30	3.63E+09	0.992655					
18	Cycle: 10	8 nM				8E-09		30	3.63E+09	0.212286					
19															
20															
21															
22															
23															
24															
25															
26															
27															
28															
29															
30															
31															
32															
33															
34															
35															
36															

\ File Properties / Baseline / Sample / Binding level / Binding stability / Binding to reference \ Beta2micro /

9-6. データの保存

File → **Save As…**をクリックする。



Save in:に保存先（C:/Bia Users/個人名など）を選択し、**File name:**にファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

補足 9-2. ファイルのアイコン

ファイルの種類によって付属のアイコンが異なる。

Biacore T100 Control ソフトウェアで保存したファイル

Biacore T100 Evaluation ソフトウェアで保存したファイル

テキスト形式で保存したデータファイル

索 引

A

Add Report point 21

Add Solvent correction 226

Adjustment for controls 187

After run 95, 149, 236, 252

Aim for immobilized level 35, 42

Analysis temperature 10, 29, 37, 61, 103, 129, 178, 197, 218, 241, 252

Application wizards 14

Assay step preparations 254, 265

Assay Steps 95, 149, 236, 247, 250

B

Base Line 51

Baseline 21, 67, 110, 135, 166, 184, 204, 225, 232, 263, 294

Batch mode 68, 81, 88

Biacore Maintenance Kit 275, 277, 278, 283, 285, 286

Binding level 67, 110, 135, 166, 184, 185, 204, 225, 294

Binding to reference 67, 110, 135, 166, 184, 190, 204, 225, 232, 294

Bivalent Analyte 72, 115

Blank Immobilization 35

Bound 40

Buffer settings 95, 149, 236, 252

Bulk Effect 45

C

Calibration Curve 127

Calibration points 127

Capture 58, 125, 175, 196, 215, 259, 260

Carry Over 58, 196, 215

Carry-Over 232,261

CFCA 143

Chi^2 ..... 75, 76, 91, 118

Concentration 53, 60, 95, 124, 127, 136, 138, 141, 149, 198, 217, 236, 252, 262

Concentration Analysis 53, 124, 136, 138, 141

Concentration unit 95, 149, 236, 252

Concentrations per cycle 98
Conditioning 58, 125, 175, 197, 215, 240, 254
Connect to cycle type 254, 265
contact time 18, 29, 49, 58, 59, 98, 99, 125, 126, 153, 154, 177, 197, 198, 216, 239, 240, 259
Control Sample definition 128, 218
Control Samples 128, 218
Copy Graph 305
crude 45
Current Fits 78, 80, 120, 122
Custom Methods 35
Custom Report Point 141, 191
Cycle Run List 61, 129, 179, 218, 256, 257
Cycle Types 97, 152, 238, 250
D
Data Collection rate 95, 149, 236, 251
Deposition solution 239
Deposition solution volume 239
Desorb 277, 278, 286
Desorb and Sanitize 278, 286
Detection 58, 95, 125, 149, 175, 196, 215, 236, 251, 259
Dissociation time 59, 98, 99, 153, 154, 177, 197, 216, 259
DMSO 3, 26, 46, 211, 212, 213, 229, 233, 251
Dock Chip 6, 276, 289
E
EDC 25, 36, 38, 40
Eject Rack 11, 19, 30, 38, 49, 64, 106, 132, 162, 181, 201, 221, 244, 271
Eject Rack Tray 11, 30, 38, 64, 106, 132, 162, 181, 201, 221, 244, 271
Empty Buffer Tubing 281, 287
End Manual run 22, 51
End Run 22, 51
Enhancement 125, 175, 260
Evaluation Variables 261, 262
Exclude Curve 140
Exclude Cycle 139
Exclude point 227
Export Curves 305

Extra wash after injection with....98, 197, 216, 260
Extrapolate....229
F
Final....39, 40
Fitting Function....136
Flow path....15, 28, 47, 58, 98, 99, 101, 125, 153, 154, 157, 175, 196, 215, 239, 240, 259, 267
Flow rate....15, 29, 47, 59, 98, 99, 126, 153, 154, 177, 197, 198, 216, 239, 240, 259
Fraction....126, 260
G
General....94, 148, 235, 249, 250, 251, 261, 262
General Settings....94, 148, 249
H
Heterogeneous Analyte....72, 115
Heterogeneous Ligand....72, 115
High viscosity solution....59, 126, 177, 198, 260
I
If…Then....261
Immobilization pH Scouting....26, 27, 28, 32, 33
Immobilization Results....43
Include Curve....140
Include Cycle....139
Incubation time....239
Inject command....18, 19, 48, 49
InjectAndRecover....261
K
k_a....24, 54, 55, 73, 75, 77, 85, 93, 116, 117, 119, 193, 194, 205, 208
k_d....24, 54, 55, 73, 75, 77, 85, 93, 116, 117, 119, 193, 194, 205, 208
K_D....24, 45, 54, 55, 56, 75, 91, 92, 93, 117, 193, 194, 205, 211
Keyword Table....66, 87, 109, 134, 165, 183, 203, 224
Kinetics Summary....85
Kinetics/Affinity....53, 57, 214, 262
km....143
M
Manual run....14, 15, 47
Method....22, 35, 42, 94, 148, 234, 248, 261, 262
Method Variables....261, 262

Methods 248
Methods and Templates ... 28, 31, 34, 38, 41, 57, 64, 106, 124, 132, 162, 174, 181, 195, 201, 214, 221, 244, 248, 271
Mix with 126, 260
Multiple R_{max} 83, 91
N
New Chip 5
NHS 23, 25, 26, 33, 35, 36, 38, 40, 44
Normalize 29, 37, 61, 103, 129, 160, 178, 199, 218, 241, 270, 285, 302
Number of cycles 59, 126
Number of injections 59, 125, 197, 216
Number of replicates 96, 97, 150, 151, 152, 237, 238, 254, 257, 265
O
On-Off Rate Map 86
Overview 94, 148, 234, 249
P
Prime 9, 29, 37, 61, 103, 129, 160, 178, 199, 218, 241, 270, 276, 277, 280, 286, 289
Print 22
Purpose 253, 254, 265
Q
Quality Assessment 92
Quality Control 73, 116
R
Rack tray 12, 13, 30, 38, 64, 106, 132, 162, 181, 201, 221, 244, 271
Ranking 186
Reagent rack, Type 1 12
Reagent rack, Type 2 12
Recovery solution 239
Recurrence 254, 255, 257, 265
Reference line 20
Reference Line 20, 51
Regeneration 50, 52, 58, 59, 98, 99, 125, 126, 153, 154, 175, 177, 196, 198, 215, 240, 259, 260
Regeneration Scouting 52
Remove Selection 70, 113
Repeat assay step within 255
Repeat calibration every 127
Repeat Control Sample（s） every 178

Report 4, 21, 75, 117, 136, 142, 189, 230, 262, 297, 298, 299
Report point 4, 21, 136, 298, 299
Report Point Table 189
Req 55, 90
Residuals 74, 76, 117, 118
Result To Excel 306
Reuse Chip 5, 7
RI 73, 75, 76, 77, 79, 116, 117, 118, 119, 121, 212
R_{max} 24, 55, 73, 75, 77, 79, 83, 84, 91, 92, 116, 117, 119, 121
S
Sample and reagent rack 12
Sample compartment temperature 29, 37, 61, 95, 103, 129, 149, 178, 197, 218, 236, 241, 251
SE 76, 119
Sensor Chip Maintenance 274, 275, 276
Sensorgram Adjustment 298, 300, 301
Show All Curves 48
Show average blank（s） 68, 88, 111
Show Curves of Same Type 48
Show Only Current Curve 48
Single mode 68, 88, 205
Single-cycle Kinetics 94, 148
Solvent correction 197, 216, 228, 229, 254, 256, 257, 261, 264, 265
Specify contact time and flow rate 35
Stabilization period 59, 98, 177, 198, 216, 260
Standard error 76, 119
Standby flow 289
Startup 59, 96, 98, 102, 125, 150, 153, 176, 197, 216, 232, 247, 254, 255, 256, 257
Steady State Affinity 90
Stop Run 65, 108, 133, 164, 182, 202, 222, 245, 273
Surface Performance 52
Surface Preparation 28, 34, 41
System Check 286
T
Target level 42
Temperature 4, 10, 29, 37, 61, 103, 208, 218, 241
Tile Horizontally 82

Tile Vertically 82
Two state Reaction 72, 115
Type 98, 99, 153, 154
U
Use average calibration Curve 136
U-value 75, 76, 118, 119
U-バリュー 75, 118
V
van't Hoff 式 194
Verification 100, 156, 249, 266
Vial/well position 18, 49
W
Wash Buffer Tubing 283
Wash solution 42, 239

あ
アイコンの説明 17
アッセイステップ 253, 254, 255, 257, 258, 264, 265
アナライト 23, 45
アフィニティー 54, 55, 56, 93
アミンカップリングキット 25
アミンカップリング法 23, 25
い
印刷 22
う
ウィザード 14
ウェット状態 290
え
Excel 形式ファイル 305, 306
お
温度設定 10
か
回収 53, 233, 238, 239, 240, 246, 261
回収の評価 246
回収溶液 233, 239

索引

解析履歴 80, 122
解離定数 24, 45, 53, 54, 55, 56, 75, 91, 93, 117, 193, 194, 205, 209, 211, 224, 230, 259
カーブフィッティング 55, 66, 78, 109, 120
カイネティクス 54, 55, 56, 93
カイ二乗 75, 91, 118
拡散係数 143, 145
拡散係数算出ツール 145
画像データファイル 305

き

キャリーオーバーチェック 223, 232, 260
緊急停止 39, 65, 108, 133, 164, 182, 202, 222, 245, 273

く

グラフ化 192
クルード 45, 277

け

結合の有無の確認 53, 174, 230, 231
結合量補正 187
検量線 24, 123, 127, 136, 137, 139, 140, 254
検量線不要の濃度測定 143

こ

固定化 7, 8, 14, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44
固定化ウィザードの中断 44
固定化量 24, 33, 35, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 83, 84, 232
固定化量の確認 40
コントロールサンプル 128, 141, 177, 178, 185, 186, 187, 190, 217, 218, 232, 254, 255, 257, 290

さ

再解析 77, 78, 79, 119, 120, 121
サイクルタイプ 253, 254, 258, 264
再生 45, 49, 50, 51, 52, 54
再生条件 45, 46, 50, 52, 53, 233
再生条件の検討 45, 52
再生溶液 45, 46, 50, 52
再生溶液の種類 46, 233
最大結合量 24, 75, 77, 91, 187
残差プロット 74, 76, 117, 118

サンプリング設定 63, 105, 131, 161, 180, 200, 220, 243, 272
サンプル位置の変更 62, 104, 130, 160, 180, 200, 219, 270
サンプル情報 61, 102, 129, 138, 144, 145, 178, 185, 199, 218, 268
サンプル情報の変更 66, 87, 109, 134, 165, 168, 171, 183, 203, 224
し
シグナルの校正 285
システムチェック 281, 286, 287
システムの洗浄 239, 277
初期結合速度 143
シングルサイクル法 45, 53, 54, 93
す
スクリーニング 24, 45, 53, 174, 211, 230, 231
スタンバイ 289
ステータスマーク 73, 116
スペック 73, 116
せ
線形解析 194, 210
センサーグラムの部分的削除 70, 113
センサーグラムの編集 292, 295
センサーチップの固定化履歴 7
センサーチップの挿入 5
センサーチップの保存 290
そ
相互作用の条件検討 45
相互作用測定 45, 53, 58, 59, 93, 193, 197, 211, 213, 216, 233, 261
阻害法 123, 126, 260
測定ポイントの削除 139, 227
ち
直接法 123
で
低分子化合物アナライト 53, 197, 211, 230, 261
データの移管 305
テキスト形式ファイル 305
電源の落とし方 289
と
ドライ状態 290

索引

ね

熱力学的解析 143, 193

の

濃度測定 24, 53, 93, 123, 125, 136, 259, 260

ノーマライズ 301, 302

は

バイアル 12, 13

バッチ解析 68, 88

バルク 212, 213, 223, 229

反応モデル 71, 72, 77, 78, 114, 115, 119, 120

反応速度定数 24, 41, 45, 53, 54, 55, 85, 93, 193, 194,

反応速度定数のマッピング 85

ひ

非線形解析 194, 210

非線形最小二乗法 55

非特異的吸着 27, 45, 124, 190, 211, 233

標準誤差 76, 119

ふ

ファイルのアイコン 307

ファイル名の変更 173, 207

フィッティング 71, 73, 74, 76, 77, 114, 116, 117, 118, 119, 123, 188

フィッティング結果の評価 76, 118

プログラムの呼び出し 248

分子量補正 187, 230, 231

へ

平衡値 55, 92

平衡値解析 87, 92

ま

マストランスポートリミテーション 24, 144, 145, 169

マニュアル測定 15, 45, 233, 239

マルチサイクル法 53, 54, 93, 205, 230

め

メソッド 14

メソッドの編集 249

メンテナンス 274, 275, 276, 286, 289

メンテナンスチップ 276

ゆ
有機溶媒 26, 46, 211
よ
溶液効果 45, 73, 75, 91, 116, 117, 124
溶媒補正 197, 212, 213, 226, 228, 229, 257, 261, 264
溶媒補正用曲線 213, 226, 227, 228, 229, 255, 257, 264
溶媒補正用曲線の延長 229
溶媒補正用曲線の削除 228
ら
ラックトレイ 11, 12, 13
ランキング 185, 187, 189, 230
ランニング緩衝液の交換 9
ランニング緩衝液の種類 3
り
リガンド 14, 23, 24, 25, 26, 27
リガンド希釈液 25, 28
リガンド希釈液の pH 選択 27
リファレンスウィンドウ 51
リファレンスセル 35, 45, 47, 67, 73, 110, 116, 124, 125, 135, 166, 184, 190, 204, 212, 213, 225, 229, 232, 294
リファレンスライン 20, 21, 50, 51
れ
レポートポイント 20, 21, 22, 50, 67297
レポートポイントの追加 20, 141, 191, 262
連続添加 54, 176

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告 誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意 誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁 止 ⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁 止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁 止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁 止

電源コード・電源プラグを傷つけない

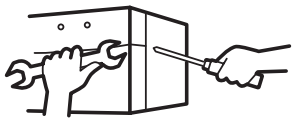
●加工しない ●束ねない ●ねじらない
●折らない ●物をのせない ●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁 止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

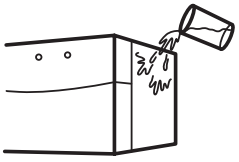
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁 止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁 止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁 止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

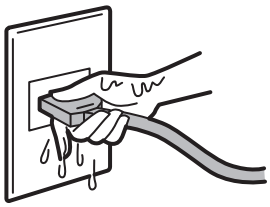
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

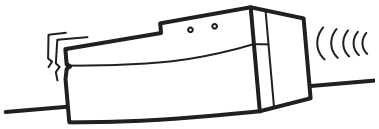
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

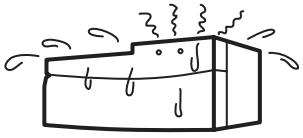
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

■製品技術情報に関して

● FAQ（製品 Q&A）

弊社 Web サイト　▶サポート　▶FAQ（製品 Q&A）

または、　FAQ　検索

● 製品マニュアル

弊社 Web サイト　▶サポート　▶製品マニュアル

● バイオダイレクトライン

TEL：03-5331-9336（営業日の 9:00 ～ 17:30）

応答メッセージが聞こえましたら、下記の番号を押してください。

クロマトグラフィー関連製品　：❶　ビアコア関連製品　：❷

電気泳動関連製品　：❸　ワットマン製品、その他製品　：❹

FAX：03-5331-9370（常時受付）

e-mail：Tech-JP@ge.com（常時受付）

● 基礎学習などに

研究者向けコミュニティ　Life Sciences Academy *

▶▶ lifesciences-ac.com

■機器アフターサービス

TEL：03-5331-9315　FAX：03-5331-9349

■納期／在庫お問合せ

TEL：03-5331-9330　FAX：03-5331-9324

注）お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

注）アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。

www.gelifesciences.co.jp

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

Intertek
ISO 9001:2008
認証取得

©2014 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。
掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。
＊ Life Sciences Academy はゼネラル・エレクトリック・カンパニイまたはその関連会社の商標です。

71-3415-35